



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Überarbeitung ausgewählter Monographien des
österreichischen Arzneibuchs

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Monika Heß
Matrikel-Nummer:	0500376
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Wien, im Oktober 2010

DANKSAGUNG

Der Tradition an dieser Stelle all jenen Menschen, die diese Diplomarbeit erst ermöglichten bzw. bei der Durchführung der praktischen Arbeit sowie des Verfassens des schriftlichen Teils behilflich waren, zu danken, möchte ich mich anschließen.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Brigitte Kopp, dass ich meine Diplomarbeit unter ihrer Leitung am Department für Pharmakognosie der Universität Wien durchführen konnte sowie für ihre wissenschaftliche Betreuung. Weiters geht mein Dank an die vom Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend eingesetzte ÖAB-Kommission für die Vergabe der Bearbeitung der beiden vorliegenden Monographien als mein Diplomarbeitsthema.

Meinen Dank spreche ich auch Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel für die Zurverfügungstellung von notwendigem Arbeitsraum sowie technischem Equipment für die Durchführung der mikroskopischen Untersuchungen im Rahmen meiner Arbeit aus.

Besonders danke ich Frau Mag. Judith Singhuber für ihre Betreuung meiner praktischen Arbeit, bei der sie mir bei Bedarf stets hilfreich zur Seite gestanden ist.

Vielen Dank auch an Frau Mag. Sylvia Vogl, die mir meine Arbeit mit praktischen Tipps im Umgang mit der Laborausstattung sowie der Geräte sehr erleichtert hat.

Der abschließende Dank gilt Frau Krones als der „guten Seele“ des Phytolabors, die immer, wenn man sie brauchte, mit Rat und Tat zugegen war.

Nicht vergessen zu danken möchte ich jedoch auch meiner Familie, die mich, wie mein ganzes Studium lang, in meinem Streben unterstützt und für meine Anliegen ein offenes Ohr gehabt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Herrn Mag. Thomas Kaumberger für seine Unterstützung in jeder Hinsicht, die ständige Aufmunterung, Ermutigung und Geduld vor allem beim Verfassen dieser Arbeit.

URHEBERRECHT

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und Ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Monika Heß

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABG	Arzneibuchgesetz
Abs	Absatz
AchE	Acetylcholinesterase
bzw.	beziehungsweise
DC	Dünnschichtchromatographie
GI	Gastrointestinal
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
LDL	low density lipoprotein
LPO	Lipidperoxidation
lt.	laut
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
p.A.	pro Analysis
Ph.Eur.	Pharmakopoea Europea (=Europäisches Arzneibuch)
ROS	radikale Sauerstoff-Spezies
Tab.	Tabelle
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
u.a.	und andere
u.a.m.	und andere mehr
v.a.	vor allem
var.	varietas (Varietät)
Vis	Visible light (=sichtbares Licht)
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	3
2.1. Material.....	3
2.1.1. Untersuchungsmaterial.....	3
2.1.2. Reagenzien und Chemikalien.....	5
2.2. Methoden.....	6
2.2.1. Dünnschichtchromatographie.....	6
2.2.2. High Performance Liquid Chromatography.....	7
3. Kalmustinktur.....	9
3.1. Historische Bedeutung und Etymologie.....	10
3.2. Inhaltsstoffe.....	11
3.3. Therapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Wirkung.....	14
3.4. Ergebnisse.....	19
3.4.1. Herstellung der Tinktur und Eigenschaften.....	19
3.4.2. Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatographie.....	19
3.4.3. Prüfung auf Reinheit.....	21
3.4.3.1. Bestimmung der Absoluten und Relativen Dichte.....	21
3.4.3.2. Bestimmung des Alkoholgehalts.....	23
3.4.3.3. Prüfung auf Methyl-/Isopropylalkohol.....	24
3.4.3.4. Bestimmung des Trockenrückstands.....	24
3.4.3.5. High Performance Liquid Chromatography.....	25
3.4.4. Gehaltsbestimmung von ätherischem Öl.....	31
4. Safran.....	33
4.1. Historische Bedeutung und Etymologie.....	35
4.2. Inhaltsstoffe.....	37
4.3. Therapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Wirkung.....	39
4.4. Ergebnisse.....	46
4.4.1. Prüfung auf Identität.....	46
4.4.1.1. Makroskopische und mikroskopische Merkmale.....	46
4.4.1.2. Dünnschichtchromatographie.....	50
4.4.2. Prüfung auf Reinheit.....	57
4.4.2.1. Färbevermögen.....	57
4.4.2.2. Bestimmung des Trocknungsverlusts.....	58
4.4.2.3. Bestimmung der Sulfatasche.....	58
4.4.3. Gehaltsbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography.....	59
5. Diskussion.....	64
6. Zusammenfassung.....	74
7. Summary.....	75
8. Literatur.....	76

1. Einleitung

§ 1 Abs 1 Arzneibuchgesetz (ABG) umschreibt den Aufgabenbereich des Arzneibuches mit der Gewährleistung des Schutzes von Mensch und Tier, insbesondere durch einwandfreie Qualität und Kontrolle von Arzneimitteln bei deren Herstellung oder Inverkehrbringen. Im Arzneibuch sind deshalb unter Bedachtnahme auf den jeweiligen Stand der Wissenschaft Grundsätze über die Bezeichnung, Herstellung, Gewinnung, Zusammensetzung, Beschaffenheit, Aufbewahrung, Abgabe und Dosierung, über die Methoden der Prüfung auf Identität, Reinheit, Gehalt und Wirkung von Arzneimitteln, über die Beschaffenheit der Behältnisse und Umhüllungen für Arzneimittel sowie über gebräuchliche Dosen und Höchstdosen von Arzneimitteln festgelegt.

Das Österreichische Arzneibuch besteht gemäß § 1 Abs 2 ABG aus dem

- ♦ Europäischen Arzneibuch (Ph.Eur.), dessen deutschsprachige Fassung als Österreichische Ausgabe bezeichnet wird, und aus dem
- ♦ Nationalen Österreichischen Arzneibuch (ÖAB).

Das Österreichische Arzneibuch wird durch den Bundesminister für Gesundheit und Umweltschutz durch Verordnung für verbindlich erklärt (§ 2 Abs 4 ABG) und liegt bei den Bezirksverwaltungsbehörden zur unentgeltlichen öffentlichen Einsicht auf (§ 2 Abs 5 ABG).

Zur Zeit wird das ÖAB mit seinen mehr als 260 Monographien von der österreichischen Arzneibuch-Kommission (ÖAB-Kommission) grundlegend überarbeitet.

Das Augenmerk bei der Harmonisierung des Österreichischen Arzneibuches liegt in der Überarbeitung der vorhandenen Monographien, der Streichung obsoleter und der Aufnahme neuer Monographien und damit der Angleichung an das Europäische Arzneibuch. Dabei werden die vorhandenen Methoden überprüft, etwaige veraltete Methoden gestrichen oder ersetzt bzw. fehlende Methoden ergänzt. Maßstab der Überprüfung ist jeweils der letzte Stand der Wissenschaft. Nebst der wissenschaftlichen Methoden soll auch die Diktion des ÖAB mit jener der Ph.Eur. harmonisiert werden. In der Übergangsphase der Bearbeitung des Arzneibuchs werden die neuen bzw. überarbeiteten Monographien in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch mit einem deutschsprachigen Haupttitel an Stelle der bisherigen lateinischen Bezeichnungen, welche jedoch im Nebentitel bestehen bleiben, versehen. Zusätzlich werden den Monographien sogenannte ÖAB-Zahlen zugeordnet.

Die ÖAB-Kommission besteht aus 2 Gremien:

- ♦ der ÖAB-Kommission und
- ♦ der ÖAB-Expertengruppe

Die Aufgabenbereiche der ÖAB-Kommission, die aus Pharmazeuten, Medizинern, Juristen und Sozialpartnern besteht, sind:

- ♦ Organisatorische Angelegenheiten und
- ♦ die Genehmigung der von der ÖAB-Expertengruppe erarbeiteten Monographien.

Der ausschließlich aus Pharmazeuten bestehenden ÖAB-Expertengruppe sind folgende Aufgaben übertragen:

- ♦ Entwicklung der Monographien,
- ♦ Publikation der Monographievorschläge mit Kommentierungsfrist,
- ♦ Bearbeitung der eingegangenen Kommentare und
- ♦ Übergabe der fertigen Monographien an die ÖAB-Kommission.

Zielsetzung

Im Rahmen der Modifikation des Österreichischen Arzneibuches wurde dem Department für Pharmakognosie unter anderem die Überarbeitung der Monographien von Flos Croci und Tinctura Calami übertragen, die ich als Thema meiner Diplomarbeit bearbeitete. Zu diesem Zwecke musste ich die beiden Monographien um neue Methoden sowie im Falle der Monographie von Safran um Zeichnungen der mikroskopischen Charakteristika ergänzen.

Als Grundlage für meine überarbeiteten Monographien habe ich die derzeit gültigen Monographien von Flos Croci, Radix Calami und Tinctura Calami im ÖAB herangezogen (s. Appendix III).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsmaterial

Kalmustinktur

Dabei handelt es sich um eine ethanolhaltige Zubereitung aus 2 Teilen getrockneter, gemahlener Kalmuswurzel und 10 Teilen Ethanol 70 Prozent, hergestellt nach dem Mazerationsverfahren des ÖAB.

Folgende Proben wurden für die Untersuchungen verwendet:

Firma	Ort	Chargennummer	Ablaufdatum
Gatt Koller	Absam, Österreich	2475/0609 2609	06/2012
Pharmonta	Gratwein, Österreich	PH-177/09	04/2014
Kwizda	Linz, Österreich	805328	01/2011

Tabelle 1 - Herkunft der Proben von Kalmustinktur

Kalmuswurzel

Verwendet wurden die getrockneten, geschnittenen unterirdischen Teile von *Acorus calamus* L. der folgenden Lieferanten:

Firma	Ort	Chargennummer	Ablaufdatum
Kottas	Wien, Österreich	KLA90732	12/2011
Martin Bauer Group	Vestenbergsreuth, Deutschland	386/10; 100047	unbekannt

Tabelle 2 - Herkunft der Proben von Kalmuswurzel

Die Kalmuswurzelproben wurden nach der Monographie Radix Calami des ÖAB 2009 auf Entsprechen der dortigen Anforderungen überprüft.

Anschließend wurden daraus selbst Tinkturen nach der aktuellen Monographie Tinctura Calami des ÖAB hergestellt.

In weiterer Folge werden die Proben in der Arbeit mit Nummern bezeichnet, die wie folgt zugeordnet werden:

Probe Nr.	Firma
1	Gatt Koller
2	Pharmonta
3	Kwizda
4	Kottas
5	Martin Bauer Group

Tabelle 3 – Probennummern von Kalmustinkturen

Safran

Die Droge, bestehend aus den getrockneten Narbenschekeln von *Crocus sativus* L., stammte von folgenden Firmen:

Firma	Ort	Chargen- / Kontrollnr.	Ablauf	Herkunft
Kottas	Wien, Österreich	KLA90978	08/2012	unbekannt
Richter	Kufstein, Österreich	B147938/KL-433816/05	06/2010	Iran
Sonnentor	Sprögnitz, Österreich	WO08100903F03	10/2010	unbekannt
Ghahestan, Iran	Iran	unbekannt	2011	Iran
Kwizda	Linz, Österreich	924035	06/2012	Iran

Tabelle 4 - Herkunft der Proben von Safran

In weiterer Folge werden die Proben in der Arbeit mit Nummern bezeichnet, die wie folgt zugeordnet werden:

Probe Nr.	Firma
1	Kottas
2	Richter
3	Sonnentor
4	Ghahestan, Iran
5	Kwizda

Tabelle 5 – Probennummern von Safran

2.1.2. Reagenzien und Chemikalien

Für die Chromatographie, die Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls, die Mikroskopie und die Methoden der Reinheits- und Identitätsprüfung wurden verwendet:

- Acetonitril (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Ameisensäure konzentriert (Gatt Koller, Absam, Österreich)
- n-Butan (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Chloralhydrat-Lösung
- Essigsäure konzentriert (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylacetat (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid
- Natriumsulfat wasserfrei ÖAB
- o-Phosphorsäure konzentriert (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
- n-Pentan (VWR, BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland)
- Toluol (Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland)

Die Lösungsmittel für die HPLC-Analysen wiesen p.A. Qualität auf.

Als Referenzsubstanzen kamen zum Einsatz:

- α -Asaron (PhytoLab, Vestenbergsreuth, Deutschland, Chargennummer: 3503)
- β -Asaron (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA, Chargennummer: S18779-309), Reinheit 98,71 Prozent
- Glucovanillin (ChromaDex, Irvine, USA, Part#: ASB-00007302-010, Lot#: 07302-601)
- Martiusgelb-Na-Salz (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA, Chargennummer: 287814-254)
- Saccharose (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz, Chargennummer: 58284 53 K)
- Shikimisäure (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA, CAS 138-59-0, C7H10O5)
- *trans*-Anethol (PhytoLab, Vestenbergsreuth, Deutschland, Chargennummer: 906)

2.2. Methoden

2.2.1. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden folgende Materialien verwendet:

Als stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

20 x 20 cm

Schichtdicke 0,25 mm

Alufolie - TLC-Platte

1.055 54.0001, Chargennummer: HX 063928

bzw.

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

10 x 10 cm

Schichtdicke 0,25 mm

HPTLC - Fertigplatte

1.056 29, Chargennummer: 0B 291342

Für das Besprühen der entwickelten Chromatogramme wurde als Sprühreagens Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens *R* verwendet, hergestellt nach der Angabe im Reagentienverzeichnis der Ph.Eur. 6.0 (s. Appendix IV).

2.2.2. High Performance Liquid Chromatography

Die flüssigchromatographische Prüfung wurde für die Reinheitsprüfung von Kalmustinktur und die Vorversuche zur Gehaltsbestimmung von Safran herangezogen.

Für die HPLC wurden folgende Geräte verwendet:

Controller	Shimadzu SCL-10A VP
Degasser	Shimadzu DGU-14A VP Degasser
Autosampler	Shimadzu SIL-10AD VP Auto Injector
Pumpe	Shimadzu LC-10AD VP Liquid Chromatograph
Detektor	Shimadzu SPD-M10A VP Diode Array Detector
Software	LCSolution

Tabelle 6 – HPLC-Module für die Analyse von Kalmustinktur

Controller	Shimadzu CBM-20A Communications Bus Module
Degasser	Shimadzu DGU-20A ₅ Degasser
Autosampler	Shimadzu SIL-20AC _{HT} Auto Injector
Pumpe	Shimadzu LC-20AD Liquid Chromatograph
Detektor	Shimadzu SPD-M20A Diode Array Detector
Column Oven	Shimadzu CTO-20AC Column Oven
Software	LC Solution

Tabelle 7 – HPLC-Module für die Analyse von Safran

Zur Überprüfung der Tinkturen 3 und 4 wurde auch die HPLC-Anlage, die sonst für die Vorversuche zur Gehaltsbestimmung von Safran eingesetzt wurde, verwendet (s. Tab. 7).

Als Säulen wurden eingesetzt:

Für die Untersuchung von Kalmustinktur:

Thermo Hypersil Keystone

Part.No. 28105-254630

BDS HYPERSIL C18

Dim. (mm) 250 x 4,6

Particle sz. (μ) 5

Batch No. 6309

Col. No. 1024430H

Zur Voruntersuchung von Safran:

Thermo Hypersil Keystone

Part.No. 28105-030

BDS HYPERSIL C18

Dim. (mm) 250 x 4

Particle sz. (μ) 5

Batch No. 5/120/6181

Col. No. 5-19921

3. *Kalmustinktur*

Kalmustinktur wird aus Kalmuswurzelstock hergestellt (ÖAB 2010, S. 513), für welchen *Acorus calamus* L. (Araceae) als Stammpflanze dient. Diese in sumpfigen Gebieten zu findende Pflanze stammt aus Ostasien und wurde erst durch Reisende in Europa und Amerika verbreitet. Die verschiedenen Varietäten unterscheiden sich im Ploidiegrad - *var. calamus* (triploid; Eurasien), *var. angustata* ENGLER (tetraploid, Ostasien) und *var. americanus* WULFF (diploid, Amerika) - und ihrem Gehalt an Inhaltsstoffen (Wagner, 1999, S. 145).

Die ausdauernde Sumpfpflanze zeichnet sich durch lineale Laubblätter und einen seitlich abstehenden Blütenstand in der Form eines grünlichen Kolbens aus (Wichtl, 2009, S. 137, s. Abb. 1).



Abbildung 1 - *Acorus calamus* L.
(aus http://www.pharmawiki.ch/wiki/media/Kalmus_1.jpg, 29.12.2009, 22:22)

Der eigentliche medizinisch verwendete Pflanzenteil - das von Blattresten und Wurzeln befreite Rhizom (s. Abb. 2, S. 10) - wird heute hauptsächlich aus osteuropäischen Ländern und Indien importiert (Wagner, 1999, S. 145).



Abbildung 2 - Kalmuswurzel getrocknet und geschnitten
 (aus http://tee24.de/images/product_images/info_images/Kalmuswurzel.jpg, 30.12.2009, 9:21)

Kalmustinktur wird aus dem getrockneten, geschnittenen Rhizom von *Acorus calamus* L. durch Extraktion mit verdünntem Ethanol hergestellt. Nach aktueller Monographie des österreichischen Arzneibuchs erfolgt die Herstellung mit 70-prozentigem Ethanol nach dem Mazerationsverfahren. Es handelt sich dabei um eine bräunlich-gelbe Flüssigkeit (ÖAB, 2010, S. 513, s. Abb. 3).

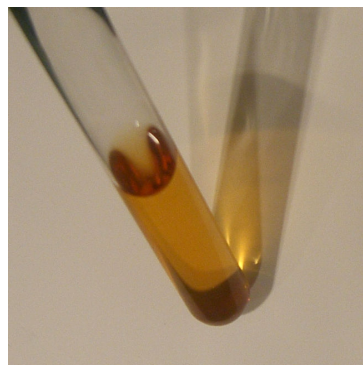


Abbildung 3 - Kalmustinktur

3.1. Historische Bedeutung und Etymologie

Das Rhizom sowie das daraus gewonnene ätherische Öl von *A. calamus* L. werden traditionell innerlich in der europäischen und asiatischen Volksmedizin, aber auch von den indigenen Völkern Nordamerikas als Rauchware und Teezubereitung angewendet, sowie weiters äußerlich in Bädern oder Umschlägen genutzt (Blaschek et al., 2007, S. 292).

Der heute verbreitete Name Kalmus entstand aus dem lateinischen „*calamus*“, welches übersetzt „*Halm*“ oder „*Rohr*“ bedeutet.

Einige alte Bezeichnungen, die heute nur noch selten gebraucht werden, sind Karremanswurzel, Deutscher Ingwer sowie Magenwurz und Ackerwurz (Blaschek et al., 2007, S. 278 und S. 287).

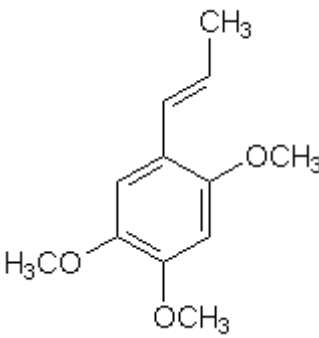
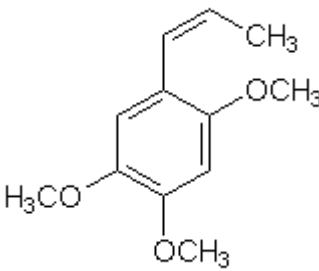
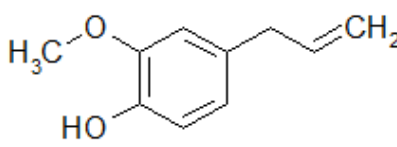
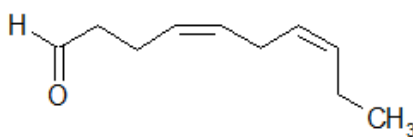
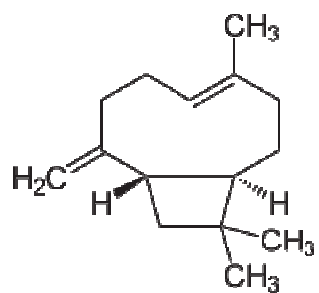
3.2. Inhaltsstoffe

Kalmuswurzel enthält laut Chen et al. (2009) 1,0 bis 3,4 Prozent ätherisches Öl. Gemäß ÖAB ist ein Gehalt von 20 ml pro Kilogramm Ganzdroge und 15 ml pro Kilogramm geschnittener Droge als Mindestgehalt, entsprechend also 2,0 bzw. 1,5 Prozent, vorgeschrieben (ÖAB, 2009, S. 349).

Zu den Komponenten des ätherischen Öls (s. Tab. 8, S 12f) zählen vor allem Phenylpropane (α -Asaron, β -Asaron = cis-Isoasaron, Eugenol), Monoterpene (z.B. [Z,Z]-4,7-Decadienal; Träger des Kalmusaromas), Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (β -Caryophyllen, Humulen u. a.) und Sesquiterpenketone (thermolabiles Acorogermacron, aus dem als Artefakte Shyobunone entstehen, Acoron und *iso*-Acoron). Als weitere Inhaltsstoffe können Bitterstoffglykoside (Acorin), Schleim, Stärke und Gerbstoffe (0,6-1 %) genannt werden (Wichtl, 2009, S. 138).

Die Zusammensetzung des ätherischen Öls und dessen Gehalt in der Droge hängen von der Chromosomenzahl und damit von der Herkunft der Pflanze ab: als charakteristisch für das ätherische Öl der diploiden und triploiden Varietäten können die Sesquiterpene vom Typ des Acorogermacrons und des Acorons und Phenylpropane wie Iso-Eugenolmethylether angesehen werden. Tri- und tetraploide Pflanzen liefern Öle mit hohem (3-13%, triploid) bis sehr hohem (bis 80%, tetraploid) β -Asaron-Gehalt, wohingegen die diploiden Unterarten nahezu asaronfreie Öle enthalten (0-0,5%), was für die Verwendung als Heilmittel wichtig ist (Wagner, 1999, S. 145).

β -Asaron zeigt laut Chen et al. (2008) eine karzinogene Wirkung auf Nagetiere und ist potenziell gentoxisch. Das ÖAB schreibt daher einen Maximalgehalt an β -Asaron von 0,5 Prozent, jedoch nicht die zu verwendende Varietät von *Acorus calamus* L., vor (ÖAB 2010, S. 349). Diese ist im Gegensatz dazu in der TCM-Monographie der Europäischen Arzneibuch - Kommission sehr wohl festgelegt; dort wird die β -asaronarme diploide Unterart vorgeschrieben.

Phenylpropane	
<i>cis</i> - α -Asaron	
<i>cis</i> - β -Asaron	
Eugenol	
Monoterpene	
[Z,Z]-4,7-Decadienal	
Sesquiterpenkohlenwasserstoffe	
β -Caryophyllen	

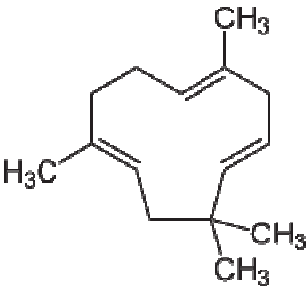
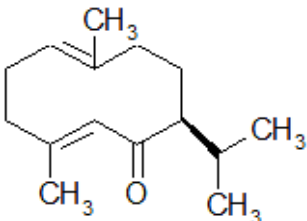
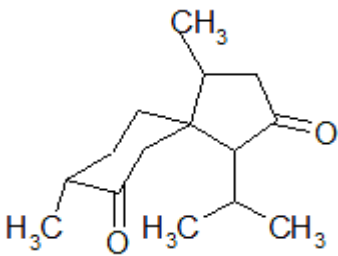
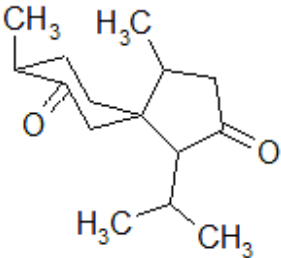
Humulen (α -Caryophyllen)	
Sesquiterpenketone	
Acorogermacron	
Acoron	
<i>iso</i> -Acoron	

Tabelle 8 - Typische Inhaltsstoffe der Kalmuswurzel

3.3. Therapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Wirkung

Kalmus war und ist in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) und dem indischen ayurvedischen System eine der wichtigsten Drogen zur Behandlung von neurologischen Störungen wie beispielsweise Epilepsie, Gedächtnisverlust, Hysterie, Melancholie, Neurosen und Schlaflosigkeit (Hazra et al., 2007). Weitere Anwendungsgebiete erfährt die Droge als Expektorans und bei Dyspepsie, als Carminativum, Diaphoretikum, Hypotensivum, Stimulans, Antipyretikum sowie als Anthelmintikum (Jain et al., 2010).

Effekte auf Blutdruck und Gefäße

Nach Shah und Gilani (2009) bewirkt der Extrakt von *A. calamus* eine Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Der Rohextrakt und die gewonnenen Ethylacetat- und nHexan-Fractionen unterscheiden sich in ihren Angriffspunkten. So bewirkt der Rohextrakt eine stärkere Senkung der Kalium-Konzentration, der Ethylacetatextrakt hingegen ist wirksamer gegen die α_1 -agonistische Wirkung von Phenylephrin. Der nHexan-Extrakt zeigt wiederum in beiden Fällen eine gleich stark ausgeprägte Wirksamkeit. Die Vorbehandlung der Aorta mit dem Rohextrakt führt zu einer Verschiebung der Calcium-Reaktionskurve nach rechts, ähnlich dem Calcium-Kanalblocker Verapamil, und löst eine endothel-unabhängige Relaxation sowie Vasodilatation aus. Die Ethylacetat-Fraktion bewirkt im Gegensatz dazu eine endothel-abhängige Relaxation und zeigt einen vasokonstriktorischen Effekt. *A. calamus* besitzt somit einen vasorelaxierenden Effekt, vermittelt durch „Calcium-Antagonismus“, und NO, andererseits vasokonstriktorische Effekte, die einer überschießenden körpereigenen Vasodilatation entgegensteuern sollen.

Neuroprotektive Effekte

Antiepileptische Effekte

In einer Studie von Hazra et al. (2007) wurde die Wirkung von Kalmus im sogenannten „Eisenchlorid-induzierten Epilepsie-Modell“ („ferric chloride-induced epileptic model“) an Ratten getestet. Dieses Modell zeigt große Ähnlichkeit zu der posttraumatischen Epilepsie beim Menschen, die in 45 Prozent aller Fälle von schweren Kopfverletzungen mit

Hämatomen als Folgeerscheinung auftritt. Als zelluläre Ursache werden aus Hämoglobin freigesetzte Eisenionen postuliert, die zur Entstehung von Sauerstoffradikalen führen. Das beim Test verabreichte Eisenchlorid induziert in gleicher Weise die Bildung freier Radikale bis zur neuronalen Lipidperoxidation (LPO) und die Bildung epileptischer Foki wie das Trauma beim Menschen. *Acorus calamus* L. verhindert die Entwicklung der Eisenchlorid-vermittelten epileptischen Anfälle durch deutliche Senkung der LPO und verringert die Ausprägung des sogenannten „wet dog shake behaviour“ in ähnlicher Weise wie das Antiepileptikum Diazepam. Die antioxidativen Effekte von *A. calamus* können das Auftreten von posttraumatischer Epilepsie bei Gabe direkt nach dem Trauma verhindern, die Droge kann daher als potentiell wirkungsvolles Antiepileptikum bezeichnet werden.

Acetylcholinesterasehemmung

Extrakte der Wurzeln und des Rhizoms von *Acorus calamus* L. werden in der traditionellen indischen und chinesischen Medizin seit Jahrhunderten zur Behandlung von Gedächtnisstörungen und zur Verbesserung der Gehirnleistung eingesetzt. Diese Effekte werden unter anderem auf eine Acetylcholinesterase-Hemmung durch die Komponenten des ätherischen Öls (vor allem α - und β -Asaron) zurückgeführt. Eine erniedrigte Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt tritt vor allem bei Morbus Alzheimer auf. Als klassisches Therapieziel wird das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) blockiert, um so den Abbau von Acetylcholin zu verhindern (Mukherjee et al., 2007).

Mukherjee et al. (2007) versuchten in ihrer Studie eine pflanzliche Alternative zu den bisher angewendeten synthetischen Wirkstoffen mit einer deutlich niedrigeren Toxizität sowie einer besseren Bioverfügbarkeit und Gehirngängigkeit zu finden. Die Inhaltsstoffe α - und β -Asaron zeigen im Vergleich mit Physostigmin eine mehr oder weniger stark ausgeprägte AChE-Hemmung. Die Wirkstärke von β -Asaron ist um etwa eine Zehnerpotenz schwächer als jene von Physostigmin, die des α -Asarons ist noch einmal um denselben Faktor geringer. β -Asaron zeigt somit das stärkste hemmende Potential der Komponenten des ätherischen Öls von Kalmus, kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und dadurch die cholinerge Aktivität des ZNS beeinflussen.

Effekte auf den Glutamattransporter

Gu et al. (2010) führten in ihrer Studie Untersuchungen mit Extrakten der chinesischen Droge *Acorus tatarinowii* SCHOTT bezüglich deren Wirkung auf den künstlich exprimierten Glutamat-Transporter EAAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten durch. Das Rhizom dieser Acorus-Art wird in China traditionell bei Bewusstseinsstörungen, Hypnogenese und als Antikonvulsivum bei Epilepsie angewendet. Die Hauptkomponente der Pflanze ist α -Asaron, welches nach Mukherjee et al. (2007) eine neuroprotektive Wirkung entfaltet, indem es NMDA-Rezeptoren blockiert.

EAAC1 ist ein bedeutender exzitatorischer Neurotransmitter-Transporter im ZNS der Säugetiere und verantwortlich für die Kontrolle der Glutamat-Konzentration im synaptischen Spalt. Der Glutamat-Transporter schützt so vor neurotoxischen Glutamatkonzentrationen im Extrazellularraum. Er ist weiters involviert in die Schmerzentstehung und verschiedene pathologische Zustände wie Epilepsie, Alzheimer und Schlaganfall. Die Aufnahme von Glutamat ist an den Co-Transport von Natrium und Protonen im Austausch gegen Kalium gebunden. Die Aktivität der EAAC1-Transporter kann sowohl durch Messung der Glutamat-Aufnahme sowie durch den glutamatvermittelten Ionenfluss festgestellt werden. Die Stimulation der Glutamat-Aufnahme sowie die Hemmung des Anionen-Efflux könnten zu einer reduzierten exzitatorischen synaptischen Aktivität führen.

Der aus dem Rhizom von *Acorus tatarinowii* gewonnene α -asaronhaltige Extrakt führt zu einer Hemmung des EAAC1 vermittelten Ionenflusses durch den Kanal sowie zu einer Stimulation der Glutamat-Aufnahme in die Oozyten. Daraus ergibt sich der Schluss, dass der durch Glutamat aktivierte Kanal-Modus durch α -Asaron stark inhibiert wird, sodass trotz erhöhtem Glutamattransport der Ionenfluss reduziert ist. Durch diese beiden Effekte - die Reduktion von Glutamat im synaptischen Spalt und einen reduzierten Einstrom von Chlorid-Ionen - wird die Zellmembran stabilisiert und somit die Hyperexzitabilität gesenkt. α -Asaron unterscheidet sich in seiner Funktion als Glutamat-Rezeptor-Hemmer von den meisten anderen Wirkstoffen solcher Art dadurch, dass es sich dabei um einen nicht-kompetitiven Inhibitor handelt. Die Substanz kann so schon in mikromolaren Konzentrationen wirksam werden, die jedenfalls bei oraler Gabe im Serum erreicht werden.

Einfluss auf den Glucose-Stoffwechsel

Effekt auf Adipozyten

Adipozyten oder Fettzellen spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2. Vor allem im Krankheitsverlauf einer Adipositas kommt es zur Vergrößerung der Fettzellen, die dadurch zur Ausschüttung von TNF α angeregt werden, welcher wiederum eine Hemmung des insulin sensitiven Glucosetransporters GLUT4 bewirkt. In der Folge resultieren daraus erhöhte Glucosewerte im Blut (Prawitt J., 2006). Der Glucosetransporter GLUT4 kommt in Fettzellen und in allen gestreiften Muskelzellen (Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen) vor und wird dort in Vesikeln gespeichert. Bei einem Anstieg des Insulinspiegels durch erhöhte Blutglucosewerte fusionieren die Vesikel mit der Plasmamembran, sodass der Blutzuckerspiegel durch Aufnahme von Glucose in die Zellen wieder gesenkt werden kann. GLUT4 hat demnach die Funktion einer bedarfsorientierten Glucoseversorgung, die bei einer Hemmung des Transporters gestört ist und zu einer vermehrten Insulinunempfindlichkeit führt (Rassow et al., 2008, S 353).

Die Wurzeln von *A. calamus* wurden unter anderem schon von den Dakota-Indianern und Indonesiern zur Behandlung von Diabetes angewendet, bislang war jedoch die wirksame Komponente nicht bekannt (Wu et al. 2007).

Wu et al. (2007) beschäftigten sich in ihrer Studie mit dieser Thematik, indem sie die Wirkung des Ethylacetat-Extraktes auf die 3T3-L1 Adipozyten-Differenzierung durch Messung der zellulären Triglyceride und die Expression von GLUT4 untersuchten. Die Differenzierung der extraktbehandelten Adipozyten, gemessen an der Zahl der GLUT4 Transporter, war vergleichbar der Reaktion auf entsprechende Dosen Rosiglitazon, was auf eine insulin-sensibilisierende Aktivität hinweist. Bei der Identifizierung der verantwortlichen Inhaltsstoffe konnte die toxische Komponente β -Asaron ausgeschlossen werden. Stattdessen wurden 2 andere wirksame Substanzen isoliert: β -Daucosterol (Sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside) und ein weiteres erstmals isoliertes Triterpenglycosid (Wu et al., 2007).

In einer weiteren Studie untersuchten Wu et al. (2009) die insulin-sensibilisierende Aktivität der Ethylacetatfraktion von Kalmus *in vitro* an Skelettmuskelzellen von Ratten und *in vivo* an Mäusen. Dabei stellten sie eine durch Insulin vermittelte gesteigerte Glucoseaufnahme in die getesteten Zellen fest. Bei den Versuchsmäusen zeigte sich, dass der Ethylacetatextrakt von *Acorus calamus* L. eine signifikante Verringerung des Blutzuckerspiegels, der freien Fettsäuren und der Triglyceride sowie eine weitere Verstärkung der durch Rosiglitazon bewirkten Cholesterin-Senkung bewirkt. Der Extrakt verringerte die Aufnahme von Nahrung

und führte nicht zu einer Gewichtszunahme, wie bei Rosiglitazon beobachtet. Auf Grund der insulin-sensibilisierenden Wirkung von *Acorus calamus* L. könnte dieser in der Therapie von Diabetes und bei kardiovaskulären Komplikationen eine Behandlungsalternative darstellen (Wu et al., 2009).

Einfluss auf Insulin-Freisetzung und α -Glucosidase

In der Publikation von Si et al. (2010) wird auf die beiden vorangegangenen Studien (Wu et al. 2007 und 2009) aufgebaut. Die bekannte positive Wirkung des Ethylacetatextrakts auf die Adipozyten-Differenzierung und die insulin-sensibilisierende Aktivität dienen als Grundlage für die Erforschung weiterer Mechanismen antidiabetischer Effekte von *A. calamus* Si et al. (2010) untersuchten außer der Ethylacetatfraktion noch weitere Fraktionen auf Aktivität bezüglich Insulin-Freisetzung und α -Glucosidase-Hemmung *in vitro*, wobei sich wiederum die schon ursprünglich aktive Fraktion als jene mit dem höchsten Potential erwies. *In vivo* testete man die Blutglucosewerte nach Gabe der besagten Extrakte bzw. nach Glucose- oder Stärkegabe an Mäusen. Ergebnis der Studie war eine deutliche die Insulinsekretion steigernde Wirkung, ähnlich der des Sulfonylharnstoffs Gliclazid, und eine ebenso starke Hemmung der α -Glucosidase und damit der Glucose-Aufnahme im Gastrointestinaltrakt wie diese von Acarbose bewirkt wird. Die Blutglucosespiegel wurden durch die Insulinfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Glucosegabe deutlich gesenkt, wobei ein rascher Wirkungseintritt und eine kurze Wirkdauer beobachtet werden konnten. Eine postprandiale Hyperglykämie kann also durch die Gabe von *Acorus calamus* L. Extrakt verhindert und der Gefahr einer Hypoglykämie gleichzeitig durch das schnelle Abklingen der Wirkung vorgebeugt werden. Als α -Glucosidase-Hemmer agiert der Extrakt als kompetitiver Inhibitor, der sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat Komplex bindet. Durch die Vorbeugung einer postprandialen Hyperglykämie wird auch die Entstehung von gefäßschädigenden „Advanced Glycosylation End Products“ hintangehalten und somit das Fortschreiten der Diabetes-Erkrankung verlangsamt und andere Stoffwechselstörungen verbessert (Si et al. 2010).

3.4. Ergebnisse

Zur Überprüfung der Kalmustinktur wurden neben der Monographie Tinctura Calami des ÖAB auch die Methoden aus der Monographie Radix Calami des ÖAB herangezogen.

3.4.1. Herstellung der Tinktur und Eigenschaften

Nach ÖAB 2010 wird die Herstellung als Bereitung bezeichnet. Diese erfolgt nach dem Mazerationsverfahren und es wird weiters ein genaues Verhältnis der verwendeten Drogenmenge und zugesetzten Lösungsmittel angegeben.

Eine Abänderung in der neuen Monographie soll nunmehr so vorgenommen werden, dass nur eine Angabe des Verhältnisses und nicht mehr des Verfahrens erfolgt.

Die Beschreibung von Kalmustinktur lautet nach derzeitiger Monographie: *„Bräunlichgelbe Flüssigkeit, die nach Kalmuswurzel riecht und schmeckt“* und wird dahingehend verändert, dass die Beschreibung von Geruch und Geschmack entfällt. Weiters wird unter der Rubrik „Beschreibung“ die Mischbarkeit angeführt. Dieses Kriterium wird auch in der neuen Monographie beibehalten, wobei der Begriff „Eigenschaften“ die Bezeichnung „Beschreibung“ ersetzt.

3.4.2. Prüfung auf Identität mittels Dünnschichtchromatographie

In der aktuellen Monographie erfolgt die Überprüfung der Identität nach folgendem Verfahren:

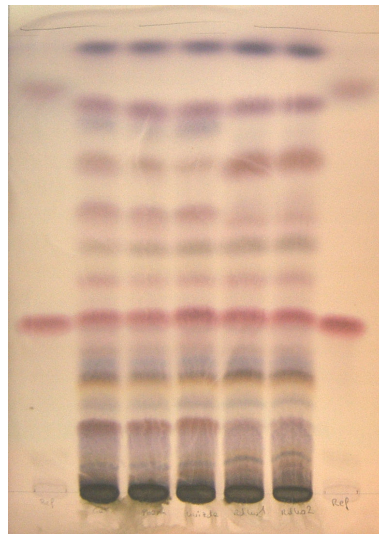
„Verdünnt man 1 ml Kalmustinktur mit 500 ml Wasser, so muß noch deutlich der Geruch nach Kalmuswurzel wahrnehmbar sein“(ÖAB 2010)

Diese Methode ist obsolet und soll daher nicht in die neue Monographie des ÖAB aufgenommen werden. Anstelle dessen wird im Folgenden eine dünnschichtchromatographische Überprüfung vorgeschlagen:

Die Überprüfung erfolgt nach der ÖAB-Monographie Kalmuswurzel (s. Appendix III), wobei auf die Abänderung in der Probenvorbereitung hingewiesen wird.

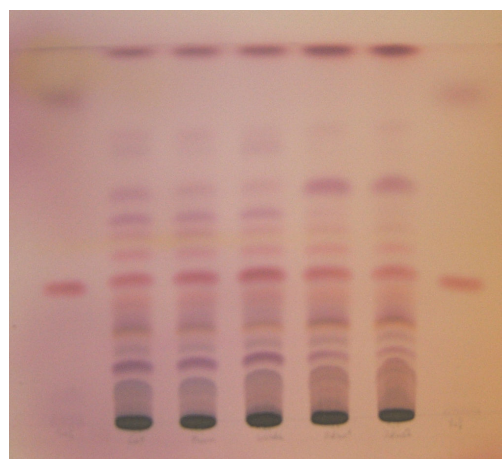
Anders als bei der Kalmuswurzel dient hier als Untersuchungslösung natürlich die Tinktur selbst.

Nachstehend sind die Chromatogramme der untersuchten Kalmustinkturen auf Alufolie-TLC (s. Abb. 4) und HPTLC-Fertigplatte (s. Abb. 5) abgebildet.



1 2 3 4 5 6 7

Abbildung 4 – Dünnschichtchromatographie von Kalmustinktur nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis; System aus ÖAB 2010 Monographie Kalmuswurzel
Auftrageschema: 1: Referenz mit β -Asaron und Anethol (10 μ l), 2-6: Kalmustinkturproben 1-5 (30 μ l), 7: Referenz mit β -Asaron und Anethol (10 μ l) auf Alufolie-TLC-Platte



1 2 3 4 5 6 7

Abbildung 5 – Dünnschichtchromatographie von Kalmustinktur nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System aus ÖAB 2010 Monographie Kalmuswurzel
Auftrageschema: 1: Referenz mit β -Asaron und Anethol (5 μ l), 2-6: Kalmustinkturproben 1-5 (15 μ l), 7: Referenz mit β -Asaron und Anethol (5 μ l) auf HPTLC-Fertigplatte

3.4.3. Prüfung auf Reinheit

Die Prüfung auf Reinheit beinhaltet laut derzeitiger Monographie folgende Kennzahlen:

- ♦ Bestimmung der Dichte
- ♦ Bestimmung des Alkoholgehalts
- ♦ Prüfung auf Methylalkohol und *iso*-Propylalkohol
- ♦ Bestimmung des Trockenrückstands

Diese Punkte wurden, bis auf die Grenzprüfung auf Methylalkohol und *iso*-Propylalkohol, nach den Vorgaben des Arzneibuches (s. Appendix IV) durchgeführt und werden im Folgenden näher erörtert.

3.4.3.1. Bestimmung der Absoluten und Relativen Dichte

Absolute Dichte nach ÖAB

In der aktuellen Monographie des ÖAB erfolgt eine Bestimmung der absoluten Dichte nach ÖAB XI, 5 wahlweise mittels Pyknometer oder mit Hilfe einer hydrostatischen Waage (s. Appendix II).

Gegenständlich wurde für die Dichtebestimmung ein Pyknometer verwendet. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Berechnung der (absoluten) Dichte erfolgt nach der Formel:

$$\rho = \frac{b - p}{v} + K$$

ρ = absolute Dichte

b = Gewicht des gefüllten Pyknometers bei 20 °C

p = Gewicht des leeren Pyknometers

v = Volumen des Pyknometers

K = Korrekturfaktor für den Auftrieb in Luft

Relative Dichte nach Ph.Eur 6.0

Zur Überprüfung der Tinkturen wurde auch eine Bestimmung der relativen Dichte nach Ph.Eur. 2.2.5 (s. Appendix IV), wiederum mittels Pyknometer, durchgeführt, welche in die überarbeitete Monographie statt der Bestimmung der absoluten Dichte aufgenommen werden soll. Auch hier wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Es erfolgte also sowohl die Bestimmung der absoluten Dichte nach ÖAB als auch die Bestimmung der relativen Dichte nach Ph.Eur., wobei nur die Ergebnisse letzterer in die neue ÖAB Monographie aufgenommen werden sollen.

Aus der untenstehenden Tabelle (Tab. 9) ist ersichtlich, dass die Dichtewerte größtenteils den derzeit im ÖAB geforderten Werten (0,895 – 0,905) entsprechen, wobei die Abweichungen nur bei den 2 selbst hergestellten Tinkturen auftraten (rote Markierung). Die absolute Dichte der untersuchten Tinkturen bewegt sich zwischen 0,8975-0,9095, das entspricht - ausgedrückt als relative Dichte - Werten von 0,8990 – 0,9110. Da in der Ph.Eur. nur mehr die relative Dichte bestimmt wird, wird für die neue Monographie für diese Kennzahl ein geforderter Bereich von 0,897 – 0,907 vorgeschlagen.

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Absolute Dichte	Mittelwert (gerundet); Entsprechung	Relative Dichte	Mittelwert (gerundet); Entsprechung
1a	0,8975	0,898	0,8990	0,899
1b	0,8975	entspricht	0,8990	entspricht
2a	0,8985	0,899	0,8995	0,900
2b	0,8990	entspricht	0,9000	entspricht
3a	0,8975	0,898	0,8990	0,899
3b	0,8980	entspricht	0,8997	entspricht
4a	0,9050	0,907	0,9067	0,908
4b	0,9080	entspricht nicht	0,9097	entspricht nicht
5a	0,9045	0,907	0,9060	0,909
5b	0,9095	entspricht nicht	0,9110	entspricht nicht

Tabelle 9 – Bestimmung von Absoluter und Relativer Dichte der Kalmustinkturproben 1-5 – Ergebnisse (Doppelbestimmung)

3.4.3.2. Bestimmung des Alkoholgehalts

Die Alkoholgehaltsbestimmung erfolgt nach der Ph.Eur 2.9.10 (s. Appendix IV), wobei im Folgenden nur auf die mengenmäßigen Unterschiede der Methode des ÖAB zu jener sonst inhaltsgleichen Methode der Ph.Eur. hingewiesen wird (Doppelbestimmung).

Alkoholgehalt nach ÖAB

Laut ÖAB XII, 7 (s. Appendix II) werden 20,00 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit mit der entsprechenden Apparatur destilliert. Hierzu werden ein bestimmter Fraktionieraufsatz mit Tropfenfänger und ein Liebigkühler verwendet.

Alkoholgehalt nach Ph.Eur.

Die Methode unterscheidet sich von jener des ÖAB vor allem in den verwendeten Flüssigkeitsmengen; so werden nicht 20,00 ml, sondern 25,00 ml als Aliquot verwendet, diese mit 100 bis 150 ml Wasser versetzt und davon 90 ml Destillat gewonnen, welches wiederum auf 100,0 ml verdünnt wird (s. Appendix IV, Ph.Eur. 2.9.10). Ein weiterer markanter Unterschied liegt in der verwendeten Apparatur, welche jedoch für die Bestimmungen im Rahmen meiner Diplomarbeit nicht zur Verfügung stand, weshalb der Einfachheit halber jene des ÖAB verwendet wurde.

Die im Rahmen der Überprüfung durchgeführte Bestimmung der Dichte erfolgte mittels Pyknometer.

Die Ergebnisse entsprechen großteils (Ausnahme: selbst hergestellte Tinkturen, s. rote Markierung) dem vom ÖAB geforderten Mindestgehalt an Ethanol von 65 Prozent (s. Tab. 10, S. 24).

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Ethanolgehalt in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a	66,8	66,8
1b	66,8	entspricht
2a	65,3	65,15
2b	65,0	entspricht
3a	66,8	66,65
3b	66,5	entspricht
4a	62,5	62,35
4b	62,2	entspricht nicht
5a	61,2	60,95
5b	60,7	entspricht nicht

Tabelle 10 – Bestimmung des Alkoholgehalts der Kalmustinkturproben 1-5 - Ergebnisse (Doppelbestimmung)

3.4.3.3. Prüfung auf Methyl-/Isopropylalkohol

Die Überprüfung des Methyl- bzw. Isopropylalkoholgehalts wurde nicht durchgeführt, da die fertig gelieferten Proben diesbezüglich ohnehin schon vom Hersteller getestet worden waren, und die selbst hergestellten Tinkturen durch dabei verwendeten vergällten Alkohol nicht den Anforderungen entsprochen hätten. Die Bestimmung erfolgt nach Ph.Eur 2.9.11 (s. Appendix IV).

3.4.3.4. Bestimmung des Trockenrückstands

Als Trockenrückstand wird jener Rückstand bezeichnet, der nach dem Verdampfen einer Flüssigkeit bei 103 – 105 °C verbleibt (ÖAB 2009, S 36).

Der Wert für den Trockenrückstand wird nach der Methode der Ph.Eur. 2.8.16 (s. Appendix IV) bestimmt (Doppelbestimmung).

Bis auf eine der selbst hergestellten Tinkturen (s. rote Markierung) entsprechen alle Tinkturen dem im ÖAB geforderten derzeitigen Wert von mindestens 3,3 Prozent (s Tab. 11, S. 25).

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Trockenrückstand in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a	3,36	3,36
1b	3,36	entspricht
2a	3,68	3,70
2b	3,71	entspricht
3a	3,70	3,75
3b	3,79	entspricht
4a	2,84	2,91
4b	2,97	entspricht nicht
5a	5,03	5,05
5b	5,06	entspricht

Tabelle 11 – Bestimmung des Trockenrückstands der Kalmustinkturproben 1-5 – Ergebnisse (Doppelbestimmung)

3.4.3.5. High Performance Liquid Chromatography

Die analytische HPLC wurde zur Überprüfung der Gehaltsobergrenze des toxischen Inhaltsstoffes β -Asaron eingesetzt. Die Durchführung erfolgte grundsätzlich nach der Monographie Kalmuswurzel des ÖAB 2010 (s. Appendix II).

Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde leicht abgeändert. Nach Durchführung der vorgeschriebenen Eignungsprüfung war es nötig, diese von 60:40 (V/V) auf 50:50 (V/V) im Verhältnis von Wasser zu Acetonitril zu ändern, um eine ausreichende Auftrennung zu erreichen (s. Abb. 8, S. 27 im Vergleich zu Abb. 12, S. 29).

Eine weitere Änderung wurde notwendigerweise bezüglich der Probenvorbereitung vorgenommen:

Zur Herstellung der Untersuchungslösung werden nun 1,0 g Tinktur mit Methanol R auf 100,0 ml aufgefüllt.

Die angewendete Methode aus der neu vorgeschlagenen Monographie Kalmustinktur lautet wie folgt:

Untersuchungslösung: 1,0 g Tinktur werden mit Methanol R auf 100,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösung a: 10,0 mg β -Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Methanol R zu 100,0 ml ergänzt.

Referenzlösung b: 10,0 mg α -Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 2,0 ml dieser Lösung werden mit Referenzlösung a zu 20,0 ml ergänzt.

Säule:

- Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R ($5 \mu\text{m}$)
- Mobile Phase: Acetonitril R, Wasser R (50:50, V/V)
- Durchflussrate: $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- Detektion: Spektrometer bei 303 nm
- Einspritzen: $20 \mu\text{l}$
- Eignungsprüfung: mindestens 1,2 zwischen den Peaks von β -Asaron und α -Asaron
- Falls erforderlich wird der Anteil an Acetonitril in der mobilen Phase geändert.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen untersucht.

Berechnung

Der Prozentgehalt an β -Asaron wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 10 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

A_1 = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Tinktur in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von β -Asaron R in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an β -Asaron in β -Asaron R, hier: 98,71 Prozent

Für Testzwecke wurde eine Tinktur mit der doppelten Menge an Kalmuswurzel gegenüber der Arzneibuchangabe selbst hergestellt. Mit dieser Tinktur wurden die ersten Versuche bezüglich Dünnschichtchromatographie und HPLC durchgeführt und von dieser Probe stammen auch die folgenden Chromatogramme (s. Abb. 6, 7 und 8, S. 27). Die Überprüfung erfolgte noch mit der unveränderten Methode der derzeitigen ÖAB-Monographie mit einem Verhältnis Wasser:Acetonitril von 60:40, in weiterer Folge als Methode 1 bezeichnet. Die Zahlenangabe bei der Peakspitze bezeichnet jeweils die Peakfläche.

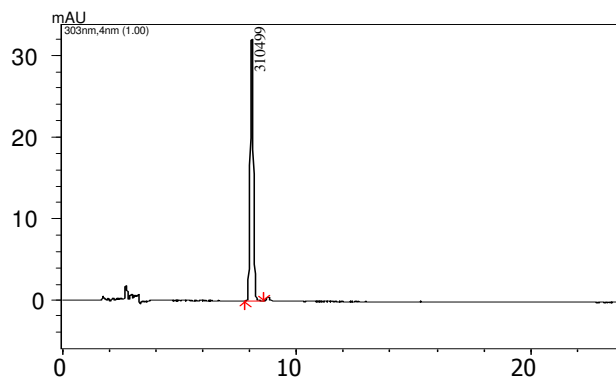


Abbildung 6 - HPLC-Chromatogramm der Referenz a (1 mg β -Asaron in 100 ml Methanol *R*) zu Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1, Peak: β -Asaron

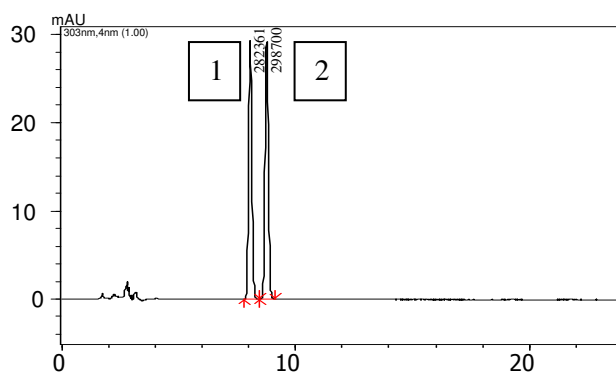


Abbildung 7 - HPLC-Chromatogramm der Referenz b (je 1 mg α - und β -Asaron in 100 ml Methanol) zu Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1, Peak 1: β -Asaron, Peak 2: α -Asaron

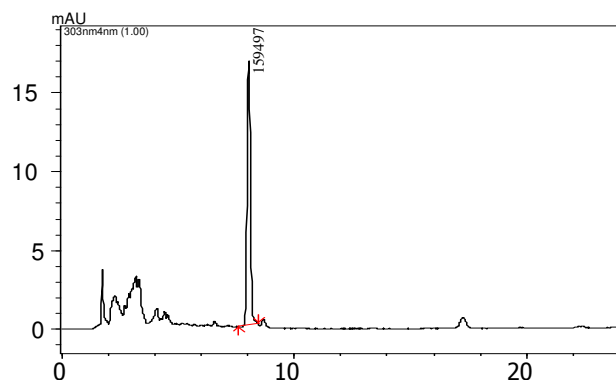


Abbildung 8 - HPLC-Chromatogramm der Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1, Peak: β -Asaron

Die Monographie fordert eine Peakauflösung (R_s) von mindestens 1,2 zwischen den Peaks von α - und β -Asaron in der Eignungsprüfung, die mit Referenz b durchgeführt wird. Gegenständlich wurde nur ein Wert von 1,17 erreicht, weiters trat eine Peaküberlagerung im Chromatogramm der Tinktur auf.

Um die geforderte Peakauflösung und eine Basislinientrennung der relevanten Peaks zu erreichen, wurde das Verhältnis der mobilen Phase in der Folge auf 50:50 abgeändert, in der vorliegenden Arbeit als Methode 2 bezeichnet, und damit die Gehaltsbestimmung der 5 Proben durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte die R_s auf 3,12 erhöht und somit eine deutlich bessere Trennleistung im Chromatogramm der Untersuchungslösungen erreicht werden.

Da die 5 Tinkturen nicht alle gleichzeitig zur Verfügung standen, wurden die Überprüfungen an 2 verschiedenen Geräten (s. Kap. 2.2.2 – High Performance Liquid Chromatography, S. 7) durchgeführt, was zu markanten Abweichungen in den Retentionszeiten führte. Im Folgenden wurden überprüft: Tinktur 1, 2 und 5 auf HPLC 1 (s. Abb. 9 bis 12, S. 28f), Tinktur 3 und 4 auf HPLC 2. Die Zahlenangaben bei der Peakspitze bezeichnen jeweils die Retentionszeit (in Minuten) und die Peakfläche. Beide sind auch Tab. 13 (s. S. 30) zu entnehmen. Die zur Berechnung notwendigen Daten der verwendeten Einwaagen von Kalmustinktur und β -Asaron in der Referenzlösung finden sich in Tab. 12 (s. S. 29).

HPLC 1:

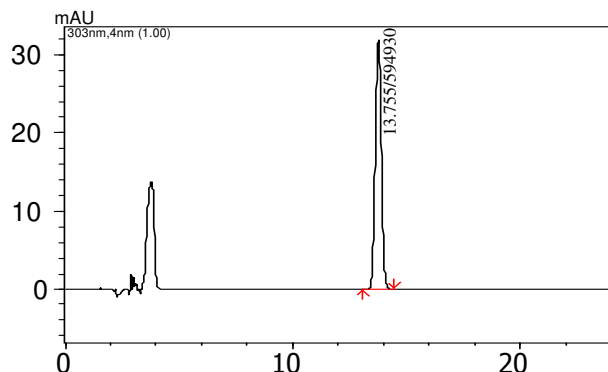


Abbildung 9 - HPLC-Chromatogramm der Referenz a (1 mg β -Asaron in 100 ml Methanol R) von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Peak: β -Asaron

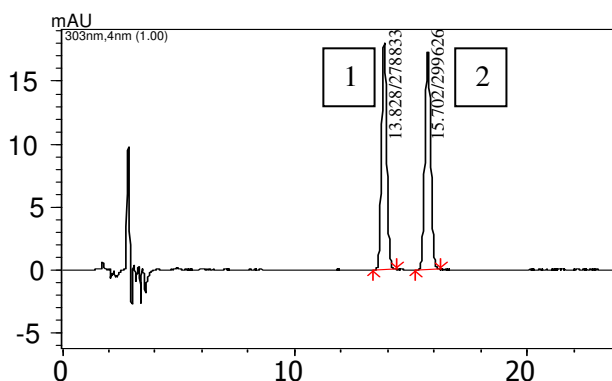


Abbildung 10 - HPLC-Chromatogramm der Referenz b (je 1 mg α - und β -Asaron in 100 ml Methanol) zu Probe 1 und 2 von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Peak 1: β -Asaron, Peak 2: α -Asaron

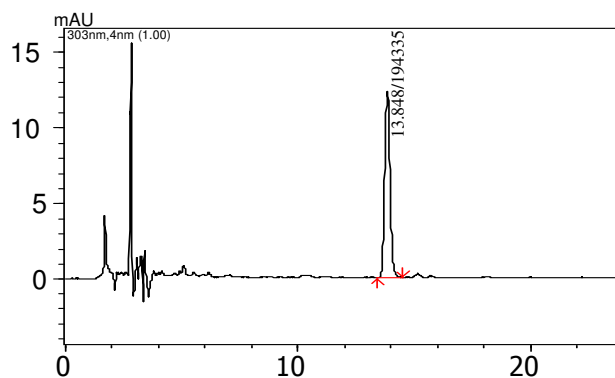


Abbildung 11 - HPLC-Chromatogramm der Probe 1a von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Peak: β -Asaron

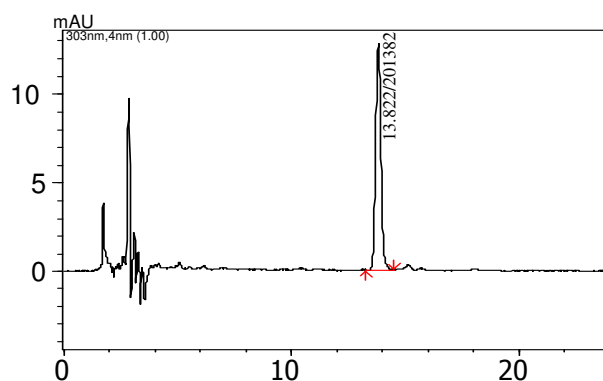


Abbildung 12 - HPLC-Chromatogramm der Probe 2a von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Peak: β -Asaron

Probennummer; Einwaage a bzw. b	Einwaage von Kalmustinktur in Gramm in der Untersuchungslösung	Einwaage von β -Asaron in Gramm in der Referenzlösung
1a	1,0088	0,01
1b	1,0071	0,01
2a	1,0442	0,01
2b	1,0605	0,01
3a	1,0888	0,01
3b	1,0223	0,01
4a	0,9869	0,01
4b	1,0186	0,01
5a	1,0566	0,01
5b	1,0146	0,01

Tabelle 12 - Einwaagen der Kalmustinkturproben 1-5 und β -Asaron in der Referenzlösung zur Bestimmung des Gehalts an β -Asaron in Kalmustinktur mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f (Doppelbestimmung)

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Retentionszeit von β -Asaron in Minuten	Peakfläche von β -Asaron
Referenz a zu 1 und 2	13,755	594930
Referenz a zu 3 und 4	7,678	630010
Referenz a zu 5	11,146	628267
1a	13,848	194335
1b	13,388	189393
2a	13,822	201458
2b	13,817	206281
3a	7,756	340973
3b	7,766	317756
4a	7,790	228115
4b	7,763	233904
5a	11,019	190137
5b	10,986	181515

Tabelle 13 - Retentionszeiten und Peakflächen von Referenz- und Untersuchungslösungen der Kalmustinkturproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f (Doppelbestimmung)

Rein rechnerisch ergibt sich aus dem Maximalgehalt von 0,5 Prozent β -Asaron in der Kalmuswurzel (Droge) und dem Ansatzverhältnis bei der Herstellung von Kalmustinktur von 1:5 ein Maximalgehalt von 0,1 Prozent β -Asaron in der Tinktur, welcher von den getesteten Proben auch eingehalten wird. Der Gehalt an β -Asaron lag zwischen 0,028 und 0,049 Prozent (s. Tab. 14).

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Gehalt an β -Asaron in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a	0,032	0,032
1b	0,031	entspricht
2a	0,032	0,032
2b	0,032	entspricht
3a	0,049	0,049
3b	0,049	entspricht
4a	0,037	0,037
4b	0,036	entspricht
5a	0,029	0,029
5b	0,028	entspricht

Tabelle 14 – Gehalt an β -Asaron der Kalmustinkturproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f (Doppelbestimmung)

3.4.4. Gehaltsbestimmung von ätherischem Öl

Als Gehaltsbestimmung wird eine Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl in der Tinktur durchgeführt. Diese Bestimmung wurde nach der Methode aus der Monographie Kamillenfluidextrakt aus der Ph.Eur. 6.0/1544 mittels Wasserdampfdestillation durchgeführt:

„20,0 g Tinktur werden in einem 1000,0-ml-Rundkolben mit 300 ml Wasser R versetzt und so lange destilliert, bis 200 ml Destillat in ein Auffanggefäß übergegangen sind. In einem Scheidetrichter werden 65 g Natriumchlorid R im Destillat gelöst. Die Lösung wird 3-mal mit je 30 ml Pentan R ausgeschüttelt, mit denen zuvor der bei der Destillation benutzte Kühler und das Auffanggefäß gespült wurden. Die vereinigten Pentanauszüge werden über 3 g wasserfreiem Natriumsulfat R getrocknet und in einen im Exsikkator 3 h lang getrockneten und gewogenen 100-ml-Rundkolben filtriert. Natriumsulfat und Filter werden 2-mal mit je 20 ml Pentan R gewaschen. Das Lösungsmittel wird in einem Wasserbad von 45 °C abdestilliert. Der letzte Rest Pentan wird durch einen Luftstrom 3 min lang abgeblasen. Der Kolben wird 3 h lang im Exsikkator getrocknet und anschließend gewogen.“ (Ph.Eur. 6.0)

Statt der in obiger Vorschrift verwendeten 2 g Natriumsulfat sind auf Grund des hohen Wasseranteiles der Kalmustinktur zur vollständigen Trocknung der Pentanauszüge 3 g wasserfreies Natriumsulfat nötig.

Zur Ermittlung der Werte wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

In der Monographie Kalmuswurzel wird ein Mindestgehalt an ätherischem Öl von 15 ml/kg für die Schnittdroge, entsprechend 1,5 Prozent gefordert. Kalmustinktur sollte auf Grund des Ansatzverhältnisses von 1:5 zwischen Droge und Extraktionsmittel zumindest ein Fünftel dieses Gehaltes, nämlich 0,3 Prozent aufweisen. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind Tab. 15 (s. S. 32) zu entnehmen. Aufgrund weitgehender Einheitlichkeit unter den erhaltenen Werten kann auf Basis dieser jedoch ein höherer Mindestgehalt an ätherischem Öl festgesetzt werden. Für die überarbeitete Monographie wird daher ein Mindestgehalt von 0,5 Prozent an ätherischem Öl vorgeschlagen.

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Gehalt an ÄÖ in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a	0,576	0,595
1b	0,613	entspricht
2a	0,552	0,601
2b	0,650	entspricht
3a	0,711	0,721
3b	0,730	entspricht
4a	0,660	0,632
4b	0,604	entspricht
5a	0,635	0,647
5b	0,658	entspricht

Tabelle 15 – Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl der Kalmustinkturproben 1-5 - Ergebnisse (Doppelbestimmung)

4. Safran

Die Stammpflanze des arzneilich verwendeten Safrans ist *Crocus sativus* L. Hierbei handelt es sich um eine Art der Gattung *Crocus* aus der Familie der Iridaceae, die vor allem vom Mittelmeerraum bis in den asiatischen Raum (Iran, Indien) verbreitet ist. *Crocus sativus* L. ist eine ausdauernde Knollenpflanze mit schmallinealen Blättern und blassvioletten Kronblättern, die zu einer Röhre verwachsen sind. Wie aus der untenstehenden Abbildung (s. Abb. 13) ersichtlich ragt der Griffel mit den 3 orangeroten Narbenschankeln aus der Perigonröhre (Blaschek et al., 2007, S 319f).



Abbildung 13 - *Crocus sativus* L.

(aus http://web.ard.de/galerie/content/classic/default/351/media/6063_safran_8.jpg, 29.12.2009, 22:06)

Als Herbstblüher bildet jede Pflanze ein bis zwei Blüten aus, die sich im Oktober beziehungsweise November öffnen. Die Vermehrung erfolgt, da es sich um eine triploide und demnach sterile Art handelt, vegetativ durch Knollen (Blaschek et al., 2007, S 319f).

Der verwendete Pflanzenteil sind die 3 Narbenschkel, die auch heute noch händisch geerntet (s. Abb. 14, S. 34) und anschließend über glühenden Kohlen oder heißer Asche getrocknet werden, damit sie ihre typische orangerote Farbe und das charakteristische Aroma erhalten. Durch diese arbeitsintensive Kultivierung und die geringe Ausbeute lässt sich leicht der hohe Preis dieser Droge begründen. Für ein Kilogramm Safran werden die Narbenschkel von bis zu 200.000 Blüten von *C. sativus* L. benötigt (Blaschek et al., 2007, S 321).



Abbildung 14 – Safranernte

(aus <http://photography.nationalgeographic.com/staticfiles/NGS/Shared/StaticFiles/Photography/Images/POD/s/saffron-field-527149-sw.jpg>, 29.12.2009, 22:20)

Eine hohe Qualität und den damit verbundenen Preis kann jedoch nur die Ganzdroge erzielen. Eine klassische Einteilung im Handel sind die Kategorien *Crocus electus*, als Bezeichnung einer griffelfreien Ware und *Crocus naturalis*, als Ware mit einem Anteil an Griffelresten (Wichtl, 2009, S 204).

Trotz vermehrter Qualitätskontrollen treten auch heute noch sehr häufig Verfälschungen dieser Droge auf. Besonders die gepulverte Droge ist nicht zuletzt wegen dieses Risikos von minderer Qualität. Daher ist vom Kauf dieser abzuraten, zumal sie auch rascher an Aroma verliert als die Ganzdroge. Zu den klassischen Verfälschungen der Ganzdroge zählen übermäßige Anteile gelber Griffelreste, künstlich nachgefärbter Safran, Narben anderer *Crocus*-arten ohne charakteristisches Aroma und/oder Färbevermögen, Beimengungen feingeschnittener orangeroter Blütenblätter; z.B. der Randblüten von *Calendula officinalis* L. oder Blüten von *Carthamus tinctorius* L. (Saflor), welche jedoch mikroskopisch unterschieden werden können. Weitere Verfälschungen, die ebenfalls unter dem Mikroskop eindeutig erkannt werden können, bestehen aus Blüten der Eselsdistel (*Onopordon acanthium* L.), der Spanischen Artischocke (*Cynara cardunculus* L.), von Arnika (*Arnica montana* L.) oder auch Klatschmohn (*Papaver rhoeas* L.). Pulverdrogen können mit Capsicumpulver,

gepulvertem Sandelholz oder Curcuma gestreckt sowie ebenfalls künstlich mit Farbstoffen wie Martiusgelb, Dinitrokresolnatrium oder Fuchsin gefärbt sein. Zur Erhöhung des Gewichts der Droge ist der Zusatz von Wasser, Glycerin, fetten Ölen oder Honig verbreitet. Auch anorganische Verbindungen wie beispielsweise Bariumsulfat, Pottasche oder Calciumcarbonat werden als Beschwerungsmittel eingesetzt (Blaschek et al., 2007, S 322ff). Die Verfälschungen mit fremdem Pflanzenmaterial sind zumeist auf Grund der mikroskopischen Untersuchung zu identifizieren, organische Farbstoffe werden durch ein verändertes Färbevermögen, konkret die Färbung von organischen Lösungsmitteln nachgewiesen. Der Zusatz von Wasser resultiert in einem erhöhten Trocknungsverlust und etwaige Beschwerungsmittel erhöhen den Anteil an sulfatunlöslicher Asche und können so erkannt werden.

Vermutlich entwickelte sich *Crocus sativus* L. aus der in Griechenland beheimateten Crocus-Art *Crocus cartwrightianus*, wurde jedoch schon sehr früh in Kulturen angebaut und so in seine heutigen Anbauggebiete gebracht. Darauf weist auch schon die Artbezeichnung „*sativus*“, welche übersetzt „*angebaut*“ bedeutet, hin (Blaschek et al., 2007, S 320f).

Für den größten Anteil des Safrans am Weltmarkt ist heute Spanien verantwortlich, gefolgt von Iran und Indien. Kleinere Vorkommen sind unter anderem in den Mittelmeerländern Frankreich, Marokko, Italien sowie in Portugal zu finden, aber auch weiter nördlich – beispielsweise in Österreich - wird Safran auch heute noch (in kleinen Mengen) angebaut (Blaschek et al., 2007, S 320).

4.1. Historische Bedeutung und Etymologie

Safran war der erste natürliche gelbe Farbstoff, der von den Menschen verwendet wurde. Schon in der späten Bronzezeit wurde die Pflanze zu diesem Zweck angebaut, worauf auch die Wandmalerei von Akrotiri auf dem heutigen Santorini - Archipel hinweist (s. Abb. 15, S. 36). Die damaligen Hauptanbauggebiete befanden sich aber in Sizilien, Syrien, Palästina, Babylon und am Fuße des Taurusgebirges (Lech et al., 2009).



Abbildung 15 - Safransammlerinnen auf der Wandmalerei von Akrotiri, späte Bronzezeit
 (aus http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saffron_gatherersSantorini-3.jpg#file, 2.2.2010, 15:03)

Im alten Ägypten wurde Safran als Medizin verwendet, war Ingredienz von Kleopatras Kosmetik und hatte auch einen besonderen Stellenwert bei der Mumifizierung. Die Erwähnungen in der damaligen Literatur sind zahlreich: Plinius beschrieb ihn als hervorragenden Farbstoff und auch in der Bibel sowie dem „Mahabharata“, dem großen indischen Epos, wurde seine Bedeutung erwähnt. Jahrhundertlang wurde *Crocus sativus* L. hauptsächlich als Farbstoff für Textilien verwendet, im Mittelalter wurde er dann auch zur Imitation von Gold auf Papier herangezogen (Lech et al., 2009).

Arzneiliche Verwendung fand Safran unter anderem als Bestandteil der folgenden Zubereitungen: Elixirium aromaticum, Laudanum, Theriak und Schwedenbitter (Blaschek et al., 2007, S 328). Bei Laudanum, auch genannt Tinctura Opii crocata, handelt es sich, wie der Name schon sagt, um eine safranhältige Opiumtinktur (nach Sydenham), deren Monographie bereits in der Pharmacopoea Austriaca 4 aus dem Jahre 1836 und auch im DAB6 (Deutsches Arzneibuch) enthalten war und welche als Antidiarrhoikum eingesetzt wurde (Pharmacopoea Austriaca 4, 1836; Hunnius, 2004, S. 1512).

Theriak wurde ursprünglich von König Mithridates (132 v. Chr.) entwickelt und galt im Mittelalter als wichtiges Arzneimittel gegen verschiedenste Krankheiten und Gebrechen. Es bestand in der ursprünglichen Zusammensetzung aus 64 Zutaten und enthielt 1 Prozent Opium. Noch 1882 wurde Theriak mit 12 Bestandteilen in der Pharmacopoeia Germanica

angeführt, wurde jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht mehr als Therapeutikum eingesetzt (Hunnius, 2004, S. 1497).

Ein allgemein gültiges Rezept für die Zubereitung gab und gibt es nicht, so wie auch sogenannten Schwedenkräuter für die Herstellung von Schwedenbitter variieren und mitunter Myrrhe, Safran, Kampher, Sennesblätter, Muskat, Kalmuswurzel u.a. enthalten können. Angewendet wird Schwedenbitter bis heute als verdauungsförderndes Mittel (Hunnius, 2004, S 1358).

Neben seiner Färbekraft wird Safran auch wegen seines Aromas geschätzt und bis heute vor allem in der asiatischen und südeuropäischen Küche als Gewürz verwendet.

Die Narbenschkel von *Crocus sativus* L. haben viele verschiedene Bezeichnungen: Crocus, Flos Croci, Stigma Croci und Stigmata Croci sind nur einige davon. Der Name Safran stammt aus dem Arabischen und steht für „gelb“ („*safra*“), die Herleitung erfolgte jedoch ursprünglich über das babylonische „*azupiru*“, welches ebenfalls „gelb“ bedeutet. In die mittelalterliche lateinische Form „*safranum*“, in welcher der Name seine hauptsächliche Verbreitung erfuhr, gelangte die Bezeichnung dann wahrscheinlich über das persische „*za-faran*“ (Blaschek et al., 2007, S321).

4.2. Inhaltsstoffe

Die Inhaltsstoffe von Safran können nach ihren Eigenschaften vor allem als Farbstoffe, klassifiziert werden. Zu diesen Farbstoffen sind insbesondere Substanzen aus der Klasse der Carotinoide zu nennen: die gelbroten Crocine (s. Tab. 16, S. 38), bei denen es sich um Mono- und Diglykoside von Crocetin (s. Tab. 16, S. 38) handelt. In weit geringerer Menge finden sich freies Crocetin s, Methylcrocetin und *trans*-Dimethylcrocetin (Blaschek et al., 2007, S 325).

Im ätherischen Öl, welches in der getrockneten Droge zu 0,4 bis 1,3 % enthalten ist, sind α - und β -Pinen, 1,8-Cineol und Safranal Hauptinhaltsstoffe. Safranal, welches für den typischen Geruch von Safran verantwortlich ist, entsteht neben β -Hydroxycyclocitral bei der Glykolyse des bitteren Terpenglucosids Picrocrocins (Wagner, 1999, S. 110, s. Tab. 16, S. 38).

Weitere Inhaltsstoffe der Droge sind Flavonoide (v.a. Kämpferolglykoside), Hydroxysafranal, Naphthalin, diverse Isophorone und weit verbreitete Carotinoide wie α - und β -Carotin und Lycopin sowie Vitamin B₂ (Riboflavin), Heteropolysaccharide, bis zu 7 % fettes Öl und 13 % Stärke (Blaschek et al., 2007, S 324f).

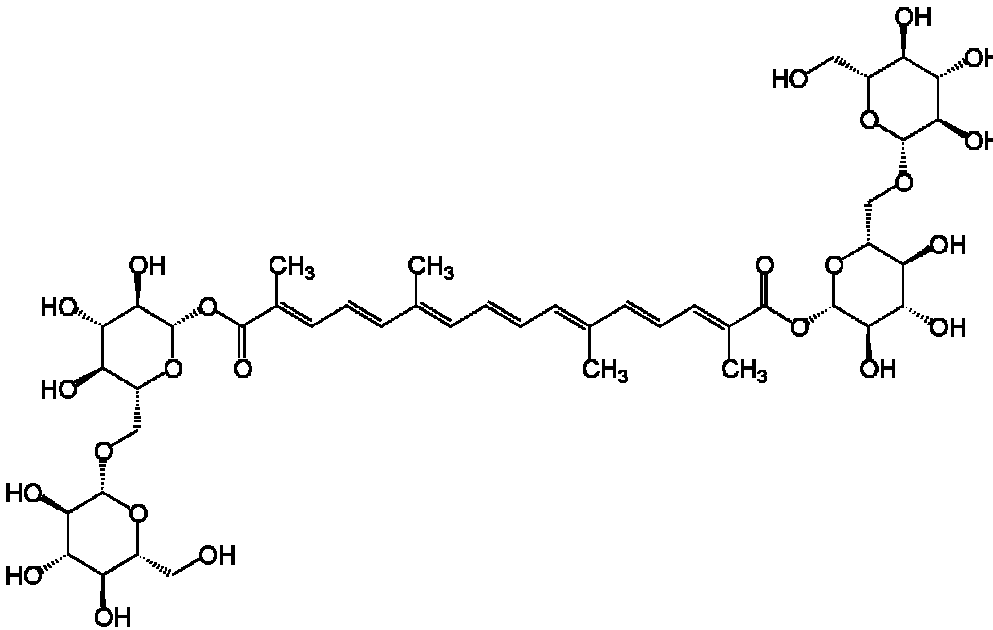
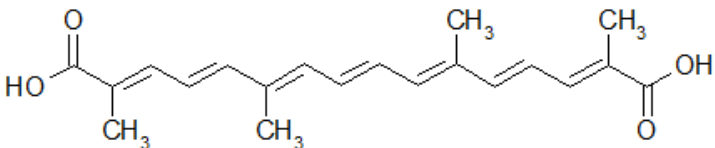
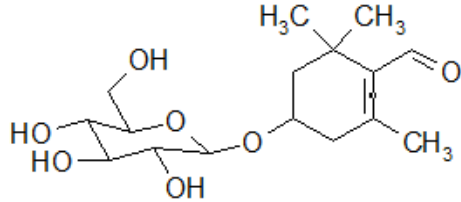
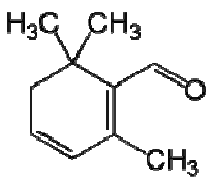
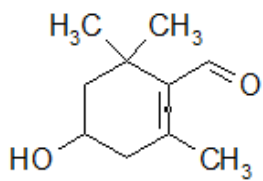
Crocin 1	
Crocetin	
Picrocrocin	
Safranal	
β -Hydroxy-cyclocitral	

Tabelle 16 - Hauptinhaltsstoffe von Safran

4.3. Therapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Wirkung

Die Verwendung von Safran findet heute noch in ebenso vielfältigen Bereichen statt, wie schon in der Vergangenheit. Als Gewürz in der Küche, als Farbstoff von den persischen Teppichfärbern, zum Anfärben von Zellen in der Histologie, als zugelassener Farbstoff in der Kosmetik (Crocetin) sowie natürlich in zahlreichen Varianten in der Volksmedizin werden die (heilenden) Eigenschaften dieser Droge weltweit genutzt (Blaschek et al., 2007, S 328f).

Als Arzneipflanze wird Safran seit dem Altertum als Stimulans, Aphrodisiakum und Antidepressivum geschätzt. Eine traditionelle Anwendung findet außerdem bei Menstruationsbeschwerden und Lebererkrankungen statt. Weiters setzt die Volksmedizin die Droge als unterstützende Behandlung von Krebsleiden ein. Die Ayurvedische Medizin schreibt Safran eine Wirkung als Adaptogen zu (Hensel und Rösing, 2003).

Nach der US-amerikanischen Pharmakopoea wird Safran als Emmenagogum und Diaphoretikum eingesetzt und hilft weiters bei Amenorrhoe, Dysmenorrhoe und Chlorose (The United States Pharmacopoeia – The National Formulary, 2008).

Die Monographie der Kommission E dokumentiert als Anwendungsgebiete die Behandlung von Krämpfen, Asthma und die Verwendung als Nervenberuhigungsmittel, weist allerdings auf eine nicht belegte Wirksamkeit hin (Wichtl, 2009, S 204). Traditionelle Anwendung findet Safran außerdem in der Homöopathie, dort hauptsächlich als krampflösendes Mittel, bei Blutungen und bei psychischen Verstimmungen (Blaschek et al., 2007, S 333).

Cytotoxische Wirkung

Für die cytotoxische Wirkung von Safran und dessen Inhaltsstoffen gibt es mehrere (theoretische) Mechanismen. Ein dosisabhängiger hemmender Effekt von Crocetin auf Nukleinsäuren und die Proteinsynthese wurde von Abdullaev et al. (1994) sowie eine Hemmung der DNA- und RNA-Synthese und der RNA-Polymerase II von Tarantilis et al. (1994) festgestellt. Tarantilis et al. (1994) untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von Crocetin auf HL-60 Leukämiezellen und fanden eine ähnlich starke Hemmung der Proliferation wie durch Retinoide bei geringerer Toxizität. Die genauen Angriffspunkte der oben erwähnten DNA-Hemmung waren Thema der Publikation von Charalabos et al. (2007), die sowohl eine externe als auch interkalative Bindung der Safran-Sekundärmetaboliten Crocetin und Dimethylcrocetin postulieren, die für die protektive Wirkung gegenüber schädlichen Einflüssen verantwortlich sein können.

Crocus sativus L. wird als potentielles Chemopräventivum in der Krebstherapie bezeichnet, welches in der Lage ist, die Tumorgenese zu hemmen bzw. zu verzögern. Weiters zeigte es in Kombination mit Cisplatin eine deutliche Reduktion der durch dieses verursachten Nebenwirkungen und eine Lebensverlängerung (Nair et al., 1991) sowie eine Stimulation der Lymphozyten-Proliferation und erhöhte Glutathion-Spiegel im Blut (Nair et al., 1992).

Als Wirkmechanismus wird daher unter anderem auch Safrans Eigenschaft als Radikalfänger angenommen, die in einer Studie an DMBA-induziertem Hautkrebs an Mäusen getestet wurde. Freie Radikale erzeugen oxidativen Stress, welcher wiederum zur Oxidation und somit zur Schädigung verschiedener Proteine und von DNA führen und damit letztendlich Genominstabilität und Krebs auslösen kann. In der vorliegenden Studie verringerte Safranextrakt das Tumorwachstum signifikant und führte zudem zu einem Anstieg der antioxidativen Enzyme wie Glutathion-S-Transferase und Superoxid-Dismutase, verbunden mit einer nachfolgenden Reduktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und der Lipidperoxidation (LPO). Die vorbeugende Gabe von Safran führte zur stärksten Wirkung, was zumindest teilweise auf eine Induktion der zellulären Abwehr als zusätzlichen Mechanismus hindeuten könnte (Das et al., 2010).

In ihrer *in vitro* Studie erforschten Aung et al. (2007) die antiproliferative Wirkung von Safranextrakt und seiner Hauptkomponente Crocin auf kolorektale Krebszellen. Das Wachstum der Krebszellen wurde dabei v.a. durch Crocin deutlich gehemmt, gesunde Zellen waren aber nicht betroffen. 2008 postulierten Tavakkol-Afshari et al., dass die cytotoxische Wirkung von Safran (auf HeLa und HepG2-Zellen) teilweise auf apoptotischen Effekten beruht, die zum programmierten Tod der Zellen führen. Weitere Untersuchungen zeigten eine dosisabhängige Proliferationshemmung in TCC-Zellen (Transitional Cell Carcinoma), der häufigsten Art von Blasenkrebs, aber nur in hohen Dosen einen cytotoxischen Effekt auf normale Bindegewebszellen (Feizzadeh et al., 2008).

Antidepressive Wirkung

Bezüglich der antidepressiven Wirkung von *Crocus sativus* L. liegen neben zahlreichen Untersuchungen der Narbenschengel auch klinische Studien über die Wirksamkeit der Blütenblätter (Moshiri et al., 2006; Basti et al., 2007) und *in vivo* Studien über jene der Knollen vor (Wang et al., 2009).

Die Affinität von Safranextrakt bzw. genauer gesagt dem Inhaltsstoff Crocetin zu NMDA- und σ_1 -Rezeptoren wird von Lechtenberg et al. (2008) als möglicher Wirkmechanismus für die antidepressive Wirkung postuliert. σ_1 -Rezeptoren wird eine modulierende Wirkung auf verschiedene Ionenkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. Calcium-Kanäle, NMDA-Rezeptoren, Dopamin- und Acetylcholin-Rezeptoren zugeschrieben. Diese unter anderem neuroprotektive Eigenschaft lässt auf ein therapeutisches Potential für die Behandlung verschiedenster neurologischer Erkrankungen wie Depression, Schizophrenie und Drogen-Abhängigkeit schließen. Die Begründung für eine beinahe ausschließliche Wirksamkeit des deglykosylierten Crocetins liegt möglicherweise darin, dass Crocine kaum im Intestinaltrakt absorbiert, dort aber zu Crocetin hydrolysiert werden, welches dann aufgenommen wird (Lechtenberg et al., 2008).

In 3 klinischen Studien wurde die Wirkung von Safran in der Behandlung von leichter bis mittelschwerer Depression im Vergleich zu Placebo (Akhondzadeh et al., 2005), Imipramin (Akhondzadeh et al., 2004) und Fluoxetin (Noorbala et al., 2005) untersucht. Die doppelblinden, randomisierten Studien erstreckten sich jeweils über den Zeitraum von 6 Wochen und fanden an 30 bis 40 Probanden statt. Dabei wurde eine deutliche antidepressive Wirkung von Safran festgestellt, deren Ausmaß die Wirkung des Placebos deutlich überstieg und in der verabreichten Dosierung den Effekten von Imipramin und Fluoxetin entsprach, auch die Nebenwirkungen der Therapien glichen einander.

Wirkung auf Lernvermögen und Gedächtnis, neuroprotektive Wirkung

Seit Jahrtausenden wird Safran in der traditionellen Medizin Chinas und Persiens unter anderem bei Gedächtnisverlust und Altersdemenz eingesetzt.

Eine Beeinträchtigung des Erinnerungsvermögens und der kognitiven Funktionen tritt häufig bei neurodegenerativen Erkrankungen auf und kann möglicherweise auf ein selektives Neuronensterben im cerebralen Cortex und Hippocampus zurückgeführt werden. Diese Gehirnregionen sind besonders stark am Lernprozess und an der Funktion des Gedächtnisses beteiligt (Abe und Saito, 2000). Als Ursache des Neuronensterbens wird unter anderem auf die Zellen wirkender oxidativer Stress angenommen, welcher durch die antioxidativen Eigenschaften von *Crocus sativus* L. verringert werden kann. Crocetin zeigte in *in vivo* Tests an einem Parkinsonismus-Modell eine protektive Wirkung gegenüber dem Einfluss von 6-OH-Dopamin auf Neuronen (Ahmad et al., 2005).

Abe und Saito untersuchten in ihrer Studie die sogenannte „Long-Term Potentiation“ (LTP), die vor allem im Hippocampus zu beobachten ist, als möglichen Mechanismus für die Funktion des Erinnerungsvermögens. Als LTP wird folgendes Phänomen bezeichnet: Durch eine vermehrte hochfrequente Stimulation der präsynaptischen Fasern des Hippocampus wurde bei Hasen ein langfristiger Anstieg der Häufigkeit postsynaptischer Potentiale festgestellt. Schon 1949 nahm Hebb an, dass das Gedächtnis durch Veränderung von synaptischen Funktionen entsteht, die von der neuronalen Aktivität abhängig sind (Hebb, 1949). In mehreren späteren Publikationen wurde *in vivo* eine Beeinträchtigung des Gedächtnisses durch LTP hemmende Substanzen festgestellt (Laroche et al., 1989; Morris et al., 1986; Watanabe et al., 1992) bzw. die Korrelation zwischen LTP-Induktion und Lernvermögen untersucht (Deupree et al., 1991; Ramirez et al., 1988; Silvia et al., 1992).

1994 hatten Zhang et al. (1994) in ihrer Studie eine positive Wirkung von Safranextrakt und Crocin auf das durch Ethanol beeinträchtigte Gedächtnis gezeigt, aber keine Verbesserung des unbeeinträchtigten Gedächtnisses festgestellt.

Weitere Untersuchungen an Ratten zeigten, dass Safranextrakt und Crocine durch LTP-Induktion wirken. Dabei wurde ein Zusammenhang von Wirkung und Struktur der Inhaltsstoffe Safrans gezeigt, wobei sich die Gentiobiosereste als essentiell für die Wirksamkeit erwiesen (Sugiura et al., 1994).

Ethanol soll weiters hemmend auf die Aktivität der NMDA-Rezeptoren wirken und so zu einer Verringerung der LTP-Induktion führen, woraus sich die Theorie ableiten lässt, dass Safran diese NMDA-Rezeptor-Hemmung antagonisiert (Abe et al., 1998).

Der Extrakt von *Crocus sativus* L. wurde von Pitsikas und Sakellaris (2006) auf seine protektive Wirkung gegenüber des schädigenden Einflusses von Scopolamin auf die Gedächtnisleistung untersucht und eine solche im „Step-through passive avoidance test“ festgestellt. Auch wurde in dieser Studie eine Verbesserung der Lernfähigkeit und des Abrufens von gespeicherten Erinnerungen im „object recognition test“ erkannt.

Alzheimerdemenz

Akhondzadeh et al. (2010) untersuchten im Rahmen einer 22-wöchigen klinischen Studie die Wirksamkeit von *Crocus sativus* L., verglichen mit Donepezil in der Behandlung der leichten bis mittelschweren Alzheimerdemenz. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch einen fortschreitenden Gedächtnisverlust, zunehmende Apathie, abnehmende Sprechfähigkeit, Desorientierung sowie Gangunregelmäßigkeiten. Als Ursachen werden heute unter anderem

eine Verringerung der cholinergen Neurotransmission, die Ablagerung von Amyloid- β -Plaques im Gehirn sowie die Zerstörung von Neuronen postuliert. Safran wird vor allem im persischen Raum traditionell bei Depression und Demenz angewendet. In der gegenständlichen Studie zeigte der standardisierte Safranextrakt gleiche Wirksamkeit wie der Acetylcholinesterasehemmer Donepezil sowie eine ähnliche Häufigkeit von Nebenwirkungen. Auf Grund der Ergebnisse dieser Studie kann, trotz relativ kleiner Anzahl an Teilnehmern (47), der Effekt von Safran auf die kognitive Funktion bestätigt werden. Der vermutete Wirkmechanismus liegt in einem antioxidativen Effekt sowie einer Hemmung der Ausbildung bzw. Aggregation der Amyloid- β -Plaques, vermutlich durch das Carotenoidgerüst (s. auch Papandreou et al., 2006).

Papandreou et al. (2006) legen der anti-amyloidogenen Aktivität von Safran dessen antioxidative Kapazität zu Grunde, da die Ausbildung der Amyloid- β -Plaques durch Oxidation gefördert werden soll. Zum Vergleich der Oxidationskraft dienen in dieser Studie Karotten und Tomaten als ebenfalls carotinoidhaltige Pflanzen, allerdings ohne Angabe deren Carotinoid-Gehalts.

Antikonvulsive, anxiolytische und sedierende Wirkung

Erstmals untersuchten Hosseinzadeh und Talebzadeh (2005) die antikonvulsive Wirkung von Safran im Vergleich zu Diazepam *in vivo* an mit dem GABA_A-Rezeptorblocker Pentylentetrazol behandelten Mäusen. Dabei stellte man eine deutliche Reduktion der tonischen Anfälle und eine verringerte Mortalität nach Behandlung mit Safranal, aber keinen antikonvulsiven Effekt nach Gabe von Crocin fest.

Die Folgestudie von Hosseinzadeh und Sadeghnia (2007) hatte zum Ziel, die möglichen Angriffspunkte von Safranal zu erforschen. Hier zeigte Safranal nur nach peripherer, nicht aber nach intracerebroventrikularer Verabreichung eine antikonvulsive Wirkung, was auf einen notwendigen Aktivierungsschritt in der Peripherie schließen lässt. Die Substanz verringerte sowohl die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten fokaler als auch generalisierter Anfälle sowie die Mortalität. Eine Vorbehandlung mit Flumazenil, einem Benzodiazepin-Antagonisten und Naloxon, einem Opioid-Rezeptor-Partialantagonisten, hemmte den protektiven Effekt des Safranals. Nach einer Gabe von Diazepam und Morphin löste Pentylentetrazol signifikant weniger epileptische Anfälle aus, wobei wiederum deren Wirkung durch eine Vorabgabe von Flumazenil und Naloxon abgeschwächt werden konnte. Aus den Ergebnissen der Studie kann als Hauptangriffspunkt von Safranal der GABA_A-

Benzodiazepin-Rezeptor-Komplex abgeleitet werden, eine Interaktion mit Opioidrezeptoren scheint ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, zur antikonvulsiven Aktivität beizutragen.

Die Affinität zu den oben genannten Rezeptoren spielt auch eine wichtige Rolle bei der Behandlung des Morphin-Entzugssyndroms. In ihrer Publikation untersuchten Hosseinzadeh und Jahanian (2009) die Wirkung der Inhaltsstoffe von *Crocus sativus* L. auf morphin-abhängige Mäuse nach Gabe von Naloxon im Vergleich zum Antikonvulsivum Clonidin. Das Ausmaß der Entzugssymptome, die von motorischer Unruhe und Krämpfen gekennzeichnet sind, wurde im „Open field test“ gemessen. Die wässrigen sowie die ethanolischen Extrakte und auch Crocin zeigten eine deutliche Reduktion der durch den Entzug gesteigerten Bewegungsaktivität der Mäuse. Diese Wirkung kann unter anderem auf einen muskelrelaxierenden, anxiolytischen und sedativen Aspekt von Safran über den GABA_A-Benzodiazepin-Rezeptorkomplex zurückzuführen sein. Die Gabe von Safranal hingegen führte zu epileptischen Anfällen, sogenanntem „wet dog shake“, Durchfall und letztlich zum Tod der Tiere. Dieser Effekt war aber nur bei morphinabhängigen und nicht bei gesunden Mäusen zu beobachten, was auf eine opioidrezeptor-antagonistische Wirkung von Safranal schließen lässt.

Die möglichen anxiolytischen, myorelaxierenden und hypnotischen Effekte von Safran im Vergleich zu dem Benzodiazepin Diazepam wurden in der Publikation von Hosseinzadeh und Noraei (2009) beschrieben. Darin untersuchte man die anxiolytische Wirkung im „Elevated plus maze test“, der auf der natürlichen Aversion von Tieren für freie Flächen basiert. Durch die Gabe von Safranextrakt, speziell aber durch Safranal, wurde die Erforschung des unbekannten Terrains, auch der freien Flächen ähnlich wie durch Diazepam gefördert, was für einen anxiolytischen Effekt der Droge spricht. Die sedative Wirkung, wiederum v.a. durch Safranal, nicht aber Crocin, lässt sich unter anderem aus einer getesteten Verlängerung der Pentobarbital-Schlafzeit ableiten. Indiz für einen myorelaxierenden Effekt ist eine Verringerung der Balance in Bewegung im sogenannten „Rotarod test“ durch den Extrakt, nicht aber durch die Einzelkomponenten Crocin und Safranal. Im „Open field test“ wurde eine Reduktion der ausgeführten Bewegungen in der Versuchsanordnung und auch der sonstigen Aktivitäten, wie Putzen oder bestimmter Körperbewegungen der Versuchsmäuse festgestellt, womit wiederum auf eine gewisse sedative und auch anxiolytische Wirkkomponente geschlossen werden kann. Nur in hohen Dosen zeigte Safran hypnotische

Wirkung. Hier wurde also gezeigt, dass v.a. Safranal für den anxiolytischen Effekt, nicht aber Crocin dafür verantwortlich ist (Hosseinzadeh und Noraei, 2009).

Pitsikas et al. postulieren in ihrer Publikation 2008 aber konträr dazu, dass Crocine in hohen Dosen sehr wohl Aktivität in diesem Bereich zeigen. Dieses Ergebnis wurde mittels einer Untersuchung von Mäusen im „light/dark-test“ erhalten, wobei die Wahrscheinlichkeit für das Schutzsuchen in der Dunkelheit und durch Stress wie Licht und unbekannte Umgebung verursachte Unruhe durch die Gabe von Crocinen in ähnlichem Ausmaß wie durch Diazepam verringert wurde.

Antiatherosklerotische Effekte

Die Wirkung von Crocetin gegen experimentell durch hyperlipidämische Diät ausgelöste Atherosklerose wurde an Wachteln untersucht (He et al., 2007). Die Ergebnisse zeigten eine (signifikante) Reduktion der Cholesterin-, Triglycerid- und LDL-Spiegel im Blut, sowie eine verminderte Ausbildung von atherosklerotischen Plaques. Weiters konnte eine Reduktion von Malondialdehyd, einem Marker für den oxidativen Status des Körpers, und eine Hemmung der Abnahme der NO-Spiegel festgestellt werden. Schon eine minimale Veränderung (hier Oxidation) des LDL kann die Genexpression in Endothelzellen induzieren und so zu einem Anstieg der Zellpermeabilität und der Expression von Adhäsionsmolekülen führen, wodurch wiederum Monozyten in die Gefäßwand einwandern können. Die Entstehung von oxidiertem LDL bedingt durch die hohe Lipidzufuhr in Verbindung mit oxidativem Stress ist ein kritischer Faktor in der Entstehung von Atherosklerose, woraus sich jedoch auch die Therapie mit Antioxidantien als möglicher Ansatzpunkt ergibt (He et al., 2007).

Die antioxidative Wirkung von Safran wurde unter anderem in den Publikationen von Assimopoulou et al. (2005) und Das et al. (2010) behandelt.

In hohen Dosen ist Safran stark toxisch. Die Dosis letalis beträgt ca. 20,0 g, aber auch geringere Mengen führen zu starken Vergiftungserscheinungen wie Erbrechen, Uterusblutungen, blutigen Durchfällen, Hämaturie und Gelbfärbung der Haut. Wegen seiner Wirkung auf den Uterus wurde Safran häufig missbräuchlich als Abortivum eingesetzt (Dosis 10,0 g), die Gelbfärbung von Haut und Skleren wurde zum Vortäuschen eines Ikterus missbraucht (Wichtl, 2009, S 204).

4.4. Ergebnisse

Zur Untersuchung der insgesamt 5 vorhandenen Proben wurden primär die Methoden der Monographie Safran des ÖAB verwendet (s. Appendix II). Da es der aktuellen Monographie von Safran an einer Gehalts- und Reinheitsprüfung mangelte, mussten diese aber ergänzt werden. Hierzu wurden zur Verwendung als Gehaltsprüfung verschiedene HPLC-Methoden aus der Monographie der Chinesischen Pharmakopoeia (Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China, 2005) und aus wissenschaftlichen Publikationen, unter anderem im Journal of Natural Medicines (Wang et al., 2010) und in Planta Medica (Lechtenberg et al., 2008), getestet. Die im Arzneibuch angeführte dünnschichtchromatographische Methode wurde abgewandelt und als Reinheitsprüfung vorgeschlagen.

4.4.1. Prüfung auf Identität

Die Überprüfung der Identität ist bei dieser teuren Droge besonders wichtig, da Verfälschungen sehr häufig zu finden sind. Nach der neuen ÖAB-Monographie werden die makroskopischen und die mikroskopischen Eigenschaften der Droge, die als erstes Kriterium zur Identifizierung von Droge sowie Verfälschungen dienen, nun auch unter diesem Punkt behandelt.

4.4.1.1. Makroskopische und mikroskopische Merkmale

Makroskopische Untersuchung

Die Droge besteht aus den ziegelroten Narben von *Crocus sativus* L., die in getrocknetem Zustand etwa 20 bis 40 mm lang sind (s. Abb. 16, S. 47). Die auf einer Seite aufgespaltenen Röhren erweitern sich nach oben, wobei der obere Rand offen und feingezackt ist. Das eventuell vorhandene, die 3 Narben zusammenhaltende Griffelstück ist blassgelb und höchstens 5 mm lang.



Abbildung 16 - Safran getrocknet
(aus Safran, Wikipedia - Die freie Enzyklopädie, 9.3.2010, 10:38).

Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop von Nikon mit Zeichentubus durchgeführt. Dabei wurden die Proben mit Chloralhydrat behandelt und bei Vergrößerungen von 40-fach bis 400-fach untersucht bzw. gezeichnet.

Als charakteristische Elemente zur Unterscheidung von bekannten Verfälschungen gelten unter anderem die langgestreckten Epidermiszellen (Länge ca. 200 μm , Breite ca. 15 μm), in deren Zentrum sich zumeist eine wallförmige Papille befindet. Weiters fallen die mit fingerförmigen, bis zu 150 μm langen Papillen besetzten oberen Narbenränder auf. Je nach Droge finden sich vereinzelte bis zahlreiche Pollenkörner mit feingetüpfelter Exine und einem Durchmesser von bis zu 120 μm . Die Leitbündel enthalten enge Gefäße (Durchmesser ca. 15 μm), welche spiralig verdickt sind. Nicht vorliegen dürfen verholzte Elemente, Fasern und Kristalle, Fragmente des Endotheciums und von Antheren sowie fremde Pollenkörner. Häufig treten letztere bei Verfälschung mit *Carthamus tinctorius* (Saflor) auf, der kleinere, 3-porige Pollenkörner besitzt.

Die folgenden selbst angefertigten Zeichnungen (s. Abb. 17 bis 21) zeigen die wichtigsten mikroskopischen Merkmale von Safran:

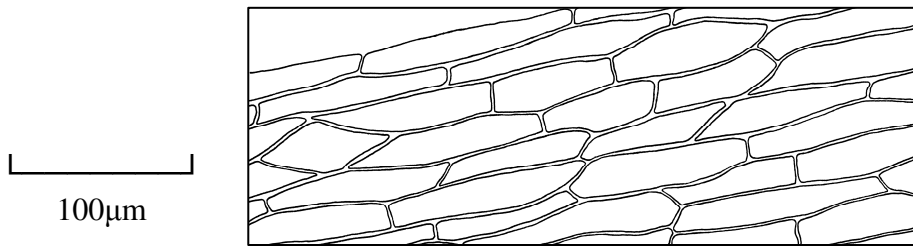


Abbildung 17 - Safran - langgestreckte Epidermiszellen

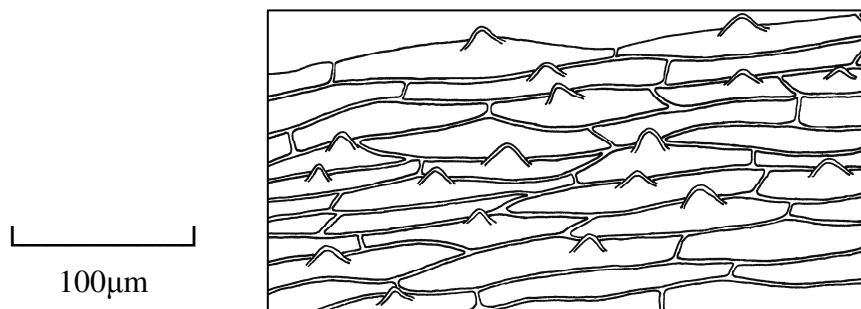


Abbildung 18 - Safran - wallförmige Papillen

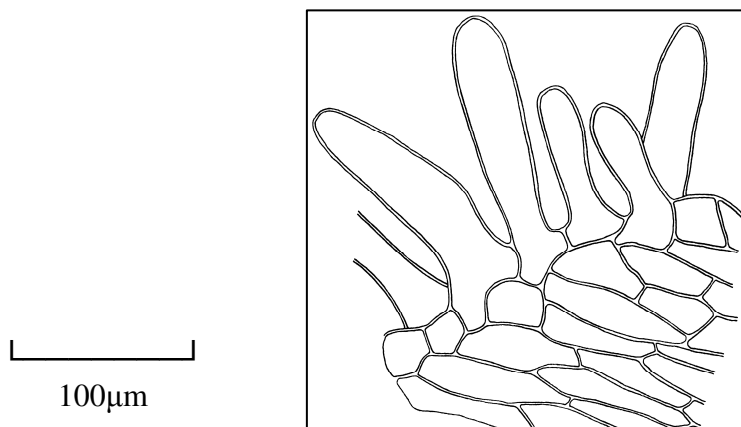


Abbildung 19 - Safran - Narbenrand mit fingerförmigen Papillen

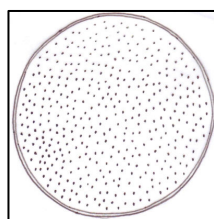


Abbildung 20 - Safran - getüpfeltes Pollenkorn

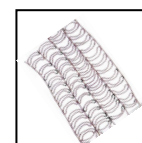
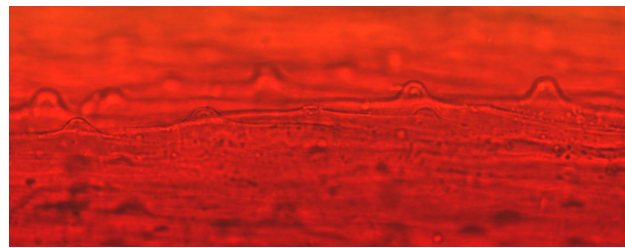


Abbildung 21 - Safran - Spiralgefäße

Zur besseren Veranschaulichung sollen die folgenden maßstabsgleichen fotografischen Aufnahmen (s. Abb. 22 bis 25, S. 49f) einiger oben dargestellter Elemente dienen:



100µm

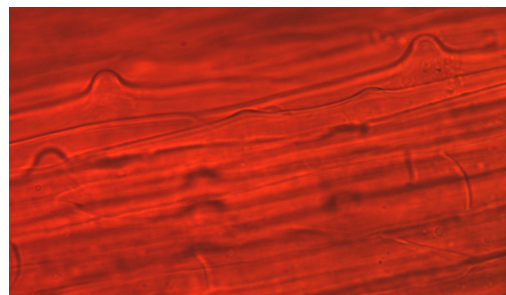


Abbildung 22 – Aufnahmen von Safran - wallförmige Papillen



100µm

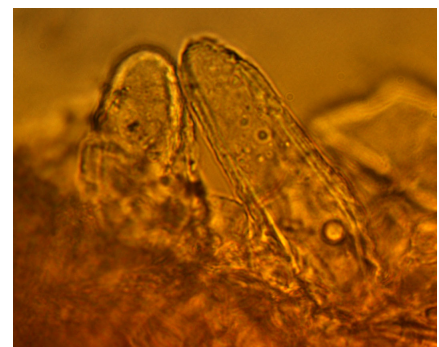


Abbildung 23 – Aufnahmen von Safran - fingerförmige Papillen

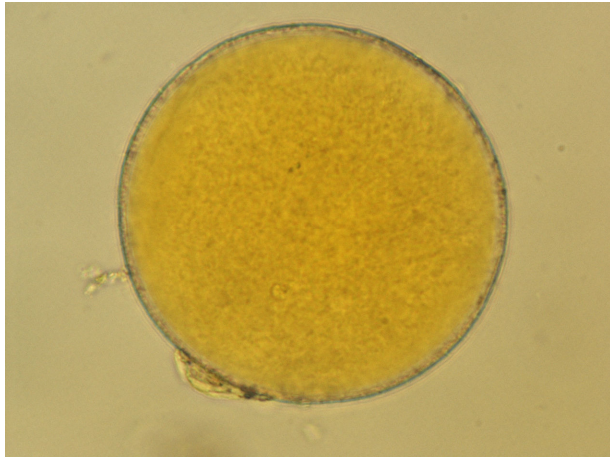


Abbildung 24 – Aufnahme von Safran - getüpfeltes Pollenkorn

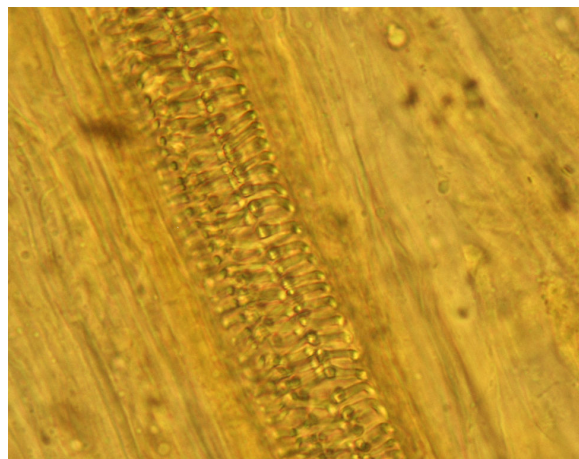
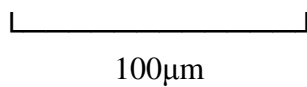


Abbildung 25 – Aufnahme von Safran - Spiralgefäße

4.4.1.2. Dünnschichtchromatographie

Für die Durchführung der dünnschichtchromatographischen Überprüfung wurde mit folgenden Systemen gearbeitet:

System 1

Aus der Monographie Safran des ÖAB 2010:

Chromatographie: Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (Ph. Eur. V.6.20.2) unter Verwendung einer Schicht Kieselgel GF₂₅₄(R).

Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagenzglas (60 mm x 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und mit 1 Tropfen Wasser benetzt. Nach 2 bis 3 Minuten wird 1 ml

Methylalkohol (R) hinzugefügt, 20 Minuten lang unter Lichtausschluß stehengelassen und durch Glaswolle abfiltriert.

Vergleichslösung: 5 mg Naphtholgelb (Ph. Eur. VII.1.1) werden in 5 ml Methylalkohol (R) gelöst. Getrennt werden 5 mg Sudanrot G (R) in 5 ml Chloroform (R) gelöst. Die beiden Lösungen werden vereinigt.

Getrennt werden auf einen Startpunkt 5 µl Untersuchungslösung oder auf einer Startlinie von 15 mm Länge und 3 mm Breite 10 µl Untersuchungslösung und 5 µl Vergleichslösung aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt über eine Laufstrecke von 10 cm mit einer Mischung von 65 Volumenteilen Essigsäureäthylester (R), 25 Volumenteilen iso-Propylalkohol (R) und 10 Volumenteilen Wasser. Nach Verdunsten der mobilen Phase wird das Chromatogramm im ultravioletten Licht bei 254 nm und im sichtbaren Licht ausgewertet, anschließend mit Anisaldehyd-Lösung (R) besprüht und unter Beobachtung 5 bis 10 Minuten lang bei 105° C erhitzt. Bei der Auswertung im Tageslicht muß das Chromatogramm der Untersuchungslösung im unteren Drittel drei gelbe Zonen zeigen, wobei die unterste am stärksten ist (Crocine). Diese Zone entspricht in Farbe und Größe der Martiusgelb-Zone im Chromatogramm der Vergleichslösung. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung muß beim Auswerten im ultravioletten Licht bei 254 nm etwa auf der gleichen Höhe eine dunkle Zone zeigen (Picrocrocine). Auf Höhe von Sudanrot G muß das Chromatogramm der Untersuchungslösung eine weitere dunkle Zone zeigen (β-Hydroxycyclocitral). Nach Besprühen mit Anisaldehyd-Lösung (R) sind Crocine und Picrocrocine graublau gefärbt.

Das Chromatogramm der Untersuchungslösung darf vor Besprühen keine weiteren gefärbten Zonen (insbesondere gelbe, orange oder rote) in Nähe der Startlinie zeigen (Zersetzungsprodukte von Crocine und/oder fremde Farbstoffe).

System 2

Mobile Phase: Ethylacetat – Isopropanol – Wasser – Ameisensäure (65:25:10:1)

Stationäre Phase: Alufolie-TLC-Platten Auftrageschema:

10 µl; bandförmig 15 mm

HPTLC-Fertigplatten Auftrageschema:

2,5 µl; bandförmig 7,5 mm

Die Probenvorbereitung wurde analog der aktuellen ÖAB - Monographie von Safran durchgeführt (s. S. 50f).

Die dünnschichtchromatographische Prüfung erfolgte zunächst nach der Methode der aktuellen ÖAB Monographie (System 1). Dabei wurden als Referenzsubstanzen die Farbstoffe Naphtholgelb S R und Sudanrot G R verwendet (s. Abb. 26, S. 52).

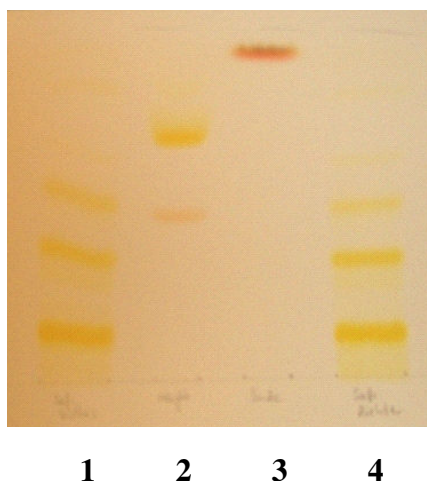


Abbildung 26 – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Sudanrot; Vis, System 1 (siehe S. 50f)

Auftrageschema: 1: Safran (10 µl), 2: Naphtholgelb S R (5 µl), 3: Sudanrot G R (5 µl), 4: Safran (10 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich, erwies sich Sudanrot G auf Grund seiner zu geringen Polarität als ungeeignet, da es bis zur Fließmittelfront läuft. In der Folge wurden auf der Suche nach der vorgeschriebenen 2. Referenzsubstanz unter anderem zahlreiche Komponenten ätherischer Öle (z.B. Citronellal, Nerodilol, Eugenol, Linalool, Geraniol, Terpeneol), verschiedene Pflanzensäuren (z.B., Ferulasäure, Kaffeesäure, Vanillinsäure, Chlorogensäure, Gentisinsäure, Rosmarinsäure; letztere 3 s. Abb. 27 A und B, S. 53), Flavonoide (Rutin; s. Abb. 28 A und B, S. 54) sowie Mono- und Disaccharide (Glucose und Saccharose; s. Abb. 28 A und B, S. 54) getestet.

Die Komponenten ätherischer Öle, die meisten der getesteten Pflanzensäuren sowie die Carotinoide waren allesamt zu lipophil für das verwendete System und waren an der Fließmittelfront zu finden.

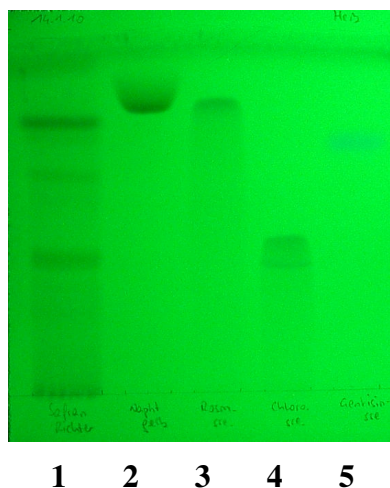


Abbildung 27 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit verschiedenen Pflanzensäuren als Referenzsubstanzen; UV 254 nm, System 1 (siehe S. 50f)
Auftrageschema: 1: Safran (10 µl), 2: Naphtholgelb S (5 µl), 3: Rosmarinsäure (5 µl), 4: Chlorogensäure (5 µl), 5: Gentisinsäure (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

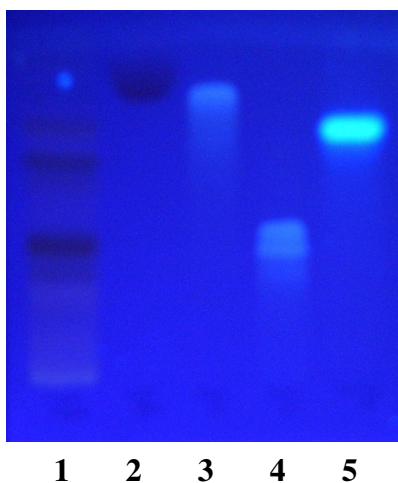


Abbildung 27 B – Dünnschichtchromatographie von Safran mit verschiedenen Pflanzensäuren als Referenzsubstanzen; UV 366 nm, System 1 (siehe S. 50f)
Auftrageschema: 1: Safran (10 µl), 2: Naphtholgelb S (5 µl), 3: Rosmarinsäure (5 µl), 4: Chlorogensäure (5 µl), 5: Gentisinsäure (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

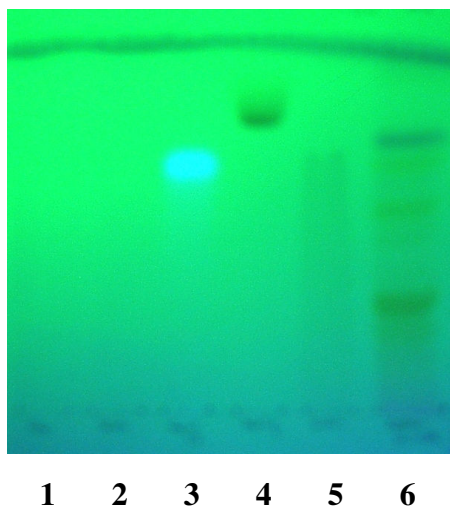


Abbildung 28 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit stark polaren Referenzsubstanzen; UV 366 nm, System 1 (siehe S. 50f)
Auftrageschema: 1: Glucose (5 µl), 2: Saccharose (5 µl), 3: Gentisinsäure (5 µl), 4: Naphtholgelb S (5 µl), 5: Rutin (5 µl), 6: Safran (10 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

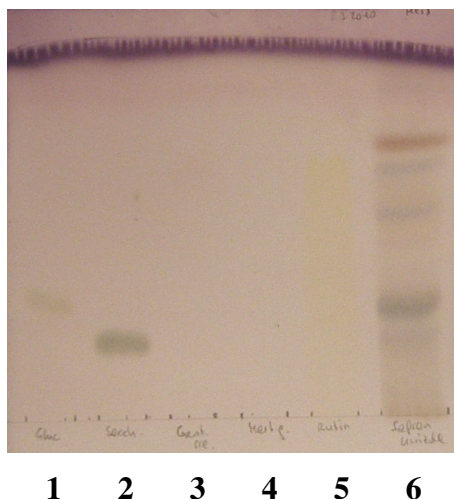
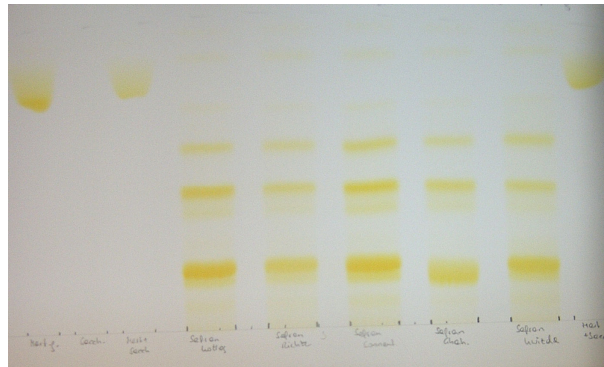


Abbildung 28 B – Dünnschichtchromatographie von Safran mit stark polaren Referenzsubstanzen, nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System 1 (siehe S. 50f)
Auftrageschema: 1: Glucose (5 µl), 2: Saccharose (5 µl), 3: Gentisinsäure (5 µl), 4: Naphtholgelb S (5 µl), 5: Rutin (5 µl), 6: Safran (10 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

Eine Vielzahl von Substanzen war nicht geeignet zur Verwendung als Referenzsubstanz, teils wegen eines zu apolaren Charakters, teils wegen Schwierigkeiten bei der Detektion und nicht zuletzt wegen fehlender Zonenschärfe (v.a. bei Chlorogensäure, Rosmarinsäure und Rutin). Letztendlich wurde Saccharose als Referenzsubstanz mit genügend hoher Polarität für den unteren Bereich des Chromatogramms ausgewählt (s. Abb. 29 A, B und C, S. 55f). Saccharose zeigt jedoch gegenüber der bislang verwendeten Referenzen einen grundlegenden Nachteil: sie ist weder im sichtbaren Licht noch im UV, sondern erst nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens detektierbar. Beim Besprühen verlieren die

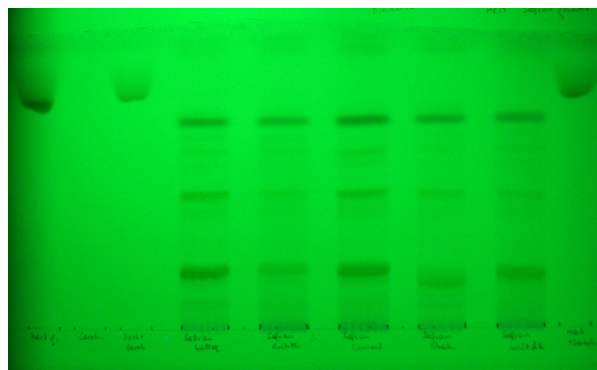
charakteristisch gelb gefärbten Inhaltsstoffe von Safran allerdings diese typische Eigenschaft und nehmen eine blaugraue Farbe an. Weitaus nachteiliger ist aber, dass auch die 1. Referenzsubstanz Naphtholgelb nach der Behandlung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens nicht mehr sichtbar ist.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Abbildung 29 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Saccharose; Vis, System 1 (siehe S. 50f)

Auftrageschema: 1: Naphtholgelb S (5 µl), 2: Saccharose R (5 µl), 3: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl), 4-8: Safranproben 1-5 (10 µl), 9: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Abbildung 29 B – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Saccharose; UV 254 nm, System 1 (siehe S. 50f)

Auftrageschema: 1: Naphtholgelb S (5 µl), 2: Saccharose R (5 µl), 3: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl), 4-8: Safranproben 1-5 (10 µl), 9: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

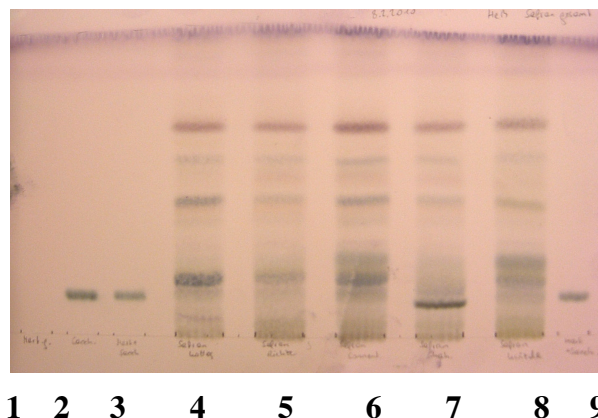


Abbildung 29 C - Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Saccharose, nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System 1 (siehe S. 50f)
Auftrageschema: 1: Naphtholgelb S (5 µl), 2: Saccharose R (5 µl), 3: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl), 4-8: Safranproben 1-5 (10 µl), 9: Naphtholgelb S und Saccharose R (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

Auf Grund der Eigenschaft des Naphtholgelbs, Schlieren zu ziehen, wurde das System im Zuge der Arbeit leicht abgeändert (s. System 2, S. 51). Da diese Veränderung jedoch keinerlei Verbesserung bezüglich der Zonenschärfe von Naphtholgelb brachte und sich durch den Zusatz von Säure zum Fließmittel diese Zone noch weiter in Richtung Fließmittelfront verschob, musste nun auch hierfür Ersatz gefunden werden. Die eigentlich für die HPLC-Methode als Referenz vorgesehene Shikimisäure bot sich an, da sie eine Strukturähnlichkeit mit dem im oberen Drittel des Chromatogramms detektierten Hydroxycyclocitral aufweist. Zusätzlich bietet diese Substanz gegenüber dem ursprünglich verwendeten Naphtholgelb den Vorteil, dass sie auch nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens detektiert werden kann (s. Abb. 30).

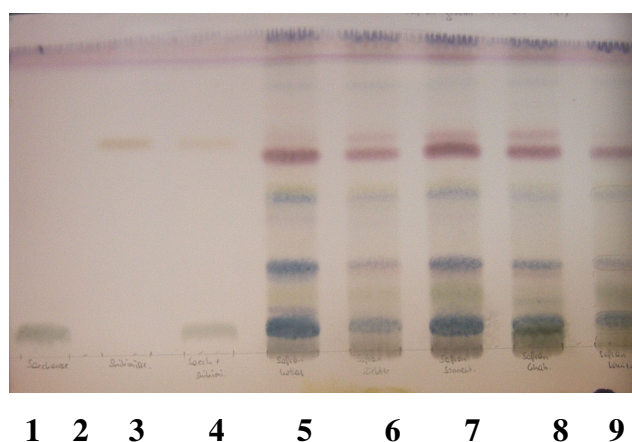


Abbildung 30 – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Saccharose und Shikimisäure, nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System 2 (siehe S. 52)
Auftrageschema: 1: Saccharose R (5 µl), 2: Shikimisäure R (5 µl), 3: Saccharose R und Shikimisäure R (5 µl), 4-8: Safranproben 1-5 (10 µl), 9: Saccharose R und Shikimisäure R (5 µl) auf Alufolie-TLC-Platte

Abschließend kann man sagen, dass sich eine Kombination der beiden Substanzen Saccharose und Shikimisäure im System 2 als am vorteilhaftesten erwiesen hat, da die vorliegende Methode dadurch auf **eine** Detektion reduziert werden kann.

4.4.2. Prüfung auf Reinheit

4.4.2.1. Färbevermögen

Die Überprüfung des Färbevermögens erfolgt nach derzeitiger ÖAB-Monographie wie folgt:

„0,10 g mittelfein gepulverte (V) Droge werden 2 Stunden lang unter gelegentlichem Schütteln mit 100 ml Wasser extrahiert. Es wird nitriert. 10 ml Filtrat, mit Wasser zu 100 ml verdünnt, dürfen nicht schwächer gefärbt sein als eine 0,05prozentige Lösung (m/V) von Kaliumdichromat (R).“ (ÖAB 2010)

Dabei wurde ein Entsprechen der untersuchten Safranproben festgestellt (s. Abb. 31). Da jedoch eine ausreichende Überprüfung der farbgebenden Inhaltsstoffe durch die chromatographische Untersuchung gegeben ist, wurde vorgeschlagen, diese Bestimmung in der neuen Monographie zu streichen.



Abbildung 31 – Färbevermögen von Safran -Vergleich von Safranextrakt (links) mit 0,05-prozentiger Kaliumdichromatlösung (rechts)

4.4.2.2. Bestimmung des Trocknungsverlusts

Der Trocknungsverlust wurde nach der Ph.Eur 2.2.32 bestimmt (s. Appendix IV). Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4 von 5 untersuchten Proben entsprachen der Arzneibuchforderung von maximal 10,0 Prozent Trocknungsverlust (s. Tab. 17), wobei es sich bei dem nicht entsprechenden Safran um eine Probe mit nicht arzneibuchkonformer Qualität handelt (siehe rote Markierung).

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Trocknungsverlust in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a 1b	4,75 4,96	4,86; entspricht
2a 2b	5,58 5,39	5,49; entspricht
3a 3b	8,12 8,42	8,27; entspricht
4a 4b	10,12 10,48	10,3; entspricht nicht
5a 5b	6,23 6,20	6,22; entspricht

Tabelle 17 – Bestimmung des Trocknungsverlustes der Safranproben 1-5 – Ergebnisse (Doppelbestimmung)

4.4.2.3. Bestimmung der Sulfatasche

Die Überprüfung wurde mit dem Rückstand der Prüfung Trocknungsverlust nach der Methode der Ph.Eur. 2.4.14 durchgeführt (s. Appendix IV). Die Proben wurden in Doppelbestimmungen untersucht.

Die Ergebnisse waren ähnlich gelagert wie bei der vorangehenden Prüfung (s. Tab. 18, S. 59); wiederum entsprach Probe Nummer 4 (siehe rote Markierung) nicht den geforderten Werten des Arzneibuches von einem Maximalgehalt an Sulfatasche von 8,0 Prozent.

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Sulfataschegehalt in Prozent	Mittelwert; Entsprechung
1a 1b	5,64 4,89	5,27; entspricht
2a 2b	5,01 4,11	4,56; entspricht
3a 3b	2,69 3,05	2,87; entspricht
4a 4b	14,14 15,67	14,91; entspricht nicht
5a 5b	7,65 7,87	7,76; entspricht

Tabelle 18 – Bestimmung der Sulfatasche der Safranproben 1-5 – Ergebnisse (Doppelbestimmung)

4.4.3. Gehaltsbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography

Die analytische HPLC soll zur Gehaltsbestimmung von Crocin 1, Crocin 2 und Picrocrocin in Safran herangezogen werden. In der aktuellen Monographie des ÖAB findet sich keine derartige Methode, weswegen zunächst verschiedene in Frage kommende Verfahren getestet werden mussten.

Als erstes wurde nach der HPLC-Methode der Monographie „Stigma Croci“ des chinesischen Arzneibuches (s. Appendix I) vorgegangen, wobei dort jedoch genaue Angaben zur zu verwendenden Säule fehlen. Die Chromatogramme zeigten nicht das gewünschte Ergebnis; die erwarteten Peaks der Crocine 1 und 2 waren nicht zu erkennen, weshalb die Methode nicht weiter eingesetzt wurde.

Anschließend wurde eine HPLC-Methode (Lechtenberg et al., 2008) getestet, wobei die angegebenen Säulen (für eine semipräparative Analyse) nicht zur Verfügung standen. Da die Anpassung an das vorhandene System keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte, konnte die Bestimmung auch mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

Schließlich gelangte die Methode nach Wang et al. (2010) zur Anwendung (mobile Phase s. S. 60 und Tab. 19, S. 60), welche eine ausreichende Detektion von Crocin 1, Crocin 2 und Picrocrocin (bei 254 nm) erlaubt (s. Abb. 32, S. 61).

Trennsystem:

Mobile Phase: Fließmittel A: Wasser *R* mit Essigsäure auf pH 2,8 eingestellt

Fließmittel B: Methanol *R*

Flussrate: 1 ml / min

Detektion: 254 nm

Einspritzen: 30 µl

Gradient:

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
0 – 1	70	30
1 – 6	70 → 55	30 → 45
6 – 20	55 → 25	45 → 75
20 – 25	25 → 10	75 → 90
25 – 30	10	90

Tabelle 19 – Fließmittelgradient für die HPLC-Untersuchung von Safran nach Wang et al. (2010)

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte analog der Methode des chinesischen Arzneibuches (s. Appendix I) durch Extraktion mit Ethanol 70 Prozent *R* auf dem Ultraschallbad:

Test solution: *Weigh accurately 10 mg of the powder (through No. 3 sieve) in a 50 ml amber coloured volumetric flask, add the quantity of dilute ethanol TS, ultrasonicate in the ice bath for 20 minutes; allow to stand cool, add dilute ethanol TS to volume and mix well. Filter and use the successive filtrate as the test solution.* (Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China, 2005)

Für die Untersuchung aller Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Berechnung

Der Prozentgehalt an Crocin 1 und 2 sowie Picrocrocin wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 10 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

A_1 = Peakfläche von Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Peakfläche von Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage des Safrans in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin in Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin

Im folgenden Chromatogramm bezeichnen die Zahlen an den Peakspitzen die Retentionszeit (in Minuten) sowie die Peakfläche der detektierten Substanzen. Die genauen Analysendaten aller Proben sind in den Tab. 20, 21 und 22 (s. S. 62) zu finden.

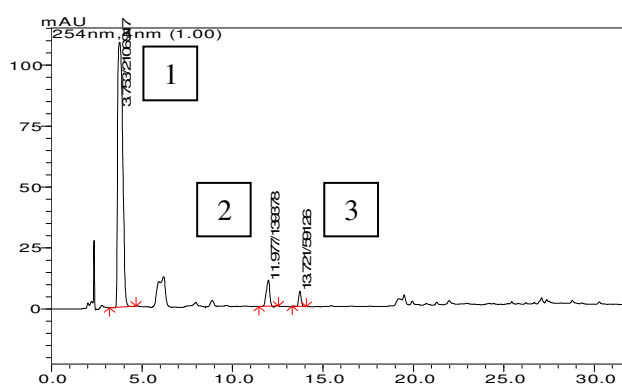


Abbildung 32 - HPLC-Chromatogramm der Probe 1b von Safran, Detektion bei 254 nm, Bedingungen siehe S. 60

Peak 1: Picrocrocin, Peak 2: Crocin 1, Peak 3: Crocin 2

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Retentionszeit von Crocin 1	Peakfläche von Crocin 1
1a	11,916	113598
1b	11,977	139378
2a	11,955	75969
2b	11,940	71182
3a	11,935	48172
3b	11,955	48677
4a	11,949	76631
4b	11,948	116648
5a	11,948	161329
5b	11,957	112280

Tabelle 20 - Retentionszeiten und Peakflächen von Crocin 1 in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60 (Doppelbestimmung)

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Retentionszeit von Crocin 2	Peakfläche von Crocin 2
1a	13,689	46940
1b	13,721	59126
2a	13,752	32988
2b	13,700	29862
3a	13,703	18796
3b	13,696	23754
4a	13,725	30220
4b	13,753	57613
5a	13,718	57530
5b	13,702	28902

Tabelle 21 - Retentionszeiten und Peakflächen von Crocin 2 in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60 (Doppelbestimmung)

Probennummer; Bestimmung a bzw. b	Retentionszeit von Picrocrocin	Peakfläche von Picrocrocin
1a	3,719	2054382
1b	3,753	2106917
2a	3,735	2091962
2b	3,727	2062684
3a	3,730	2056435
3b	3,725	2070606
4a	3,724	2058431
4b	3,731	2050129
5a	3,732	2066051
5b	3,735	2061050

Tabelle 22 - Retentionszeiten und Peakflächen von Picrocrocin in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60 (Doppelbestimmung)

Als problematisch erwies sich allerdings die Wahl der Referenzsubstanz zur Berechnung des Gehalts an Inhaltsstoffen. Als interner Standard wurde zunächst Glucovanillin erprobt, welches jedoch nicht in genügender Reinheit für die HPLC erhältlich war. Es wurde daraufhin Shikimisäure im selben System getestet, wobei folgendes Problem auftrat: die Retentionszeiten der Referenz und des Inhaltsstoffs Picrocrocin waren ident. Um hier eine bessere Auftrennung zu erreichen, wurde der pH-Wert im Bereich von 2,0 - 2,8 mehrfach verändert und alternativ zu konzentrierter Essigsäure, auch Phosphorsäure und Ameisensäure getestet. Die Analysenzeiten und der Gradient wurden variiert, doch auch das führte nicht zum gewünschten Erfolg. Die Peaks der Referenzsubstanz und des Picrocrocins ließen sich dennoch nicht um mehr als einige Sekunden auftrennen. Aus diesem Grund erscheint der interne Standard Shikimisäure als nicht geeignet und eine Verwendung von Crocin 1, Crocin 2 bzw. Picrocrocin als externen Standard unumgänglich. Mangels dieser Referenzsubstanzen konnte der Gehalt der Proben an Crocin 1, Crocin 2 und Picrocrocin trotz geeigneter Methode bislang jedoch nicht bestimmt werden.

Lechtenberg et al. (2008) untersuchten eine große Anzahl Safranproben verschiedener Herkunft. Die Werte an Crocinen und Picrocrocin variierten dabei stark. Als Mittelwert können jedoch für den Gehalt an Gesamtcrocinen, die sich zusammensetzen aus Crocin 1, Crocin 2, Crocin 4 und *cis*-Crocin 17,9 Prozent angegeben werden, wobei über 40 Prozent der getesteten Proben einen Gehalt von mehr als 40 Prozent an Gesamtcrocinen aufwiesen. Für den Anteil an Crocin 1 ergab sich ein mittlerer Wert von 12,49 Prozent, für Crocin 2 von 4,56 Prozent. Der Gehalt an Picrocrocin betrug im Mittel 9,00 Prozent. Auf Grund dieser Messwerte wurde in der oben genannten Publikation ein Mindestgehalt an Gesamtcrocinen von 20 Prozent und an Picrocrocin von 6 Prozent angegeben.

5. Diskussion

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden die ÖAB-Monographien von Safran, Synonym *Croci stigma*, und Kalmustinktur, Synonym *Calami tinctura*, grundlegend überarbeitet. Dies war nötig, da die vorliegenden Monographien nicht mehr dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprachen und daher überprüft und ergänzt werden mussten.

Die Abbildungen der beiden Monographien des ÖAB, die Grundlage meiner Überarbeitung waren, sowie die Monographie der Kalmuswurzel des ÖAB, die ich größtenteils als Vorlage für die neue Monographie der Kalmustinktur verwenden konnte, finden sich im Appendix III.

Beide Drogen haben eine lange Geschichte traditioneller Anwendung und wurden neben der europäischen Volksmedizin auch in vielen anderen Medizinsystemen wie der TCM und dem indischen ayurvedischen System eingesetzt (s. Kapitel 3.3, S. 14ff und Kapitel 4.3, S. 39ff).

Aufgrund dieser traditionell erwiesenen sowie durch Studien belegten Wirksamkeit und nicht zuletzt auch wegen des im Falle des Safrans nach wie vor bestehenden hohen Verfälschungsrisikos, besteht die Notwendigkeit, diese beiden Pflanzen bzw. deren Zubereitungen auch weiterhin in Monographien des ÖAB zu behandeln.

Im Folgenden werden die vorgenommenen Veränderungen an den Monographien zusammenfassend dargestellt:

Eine in beiden Monographien vorgenommene Änderung betrifft die Bezeichnung der Droge bzw. Zubereitung. An Stelle der lateinischen Bezeichnung in der Variante des ÖAB tritt nun die deutsche Bezeichnung, hier Safran bzw. Kalmustinktur. Die lateinische Bezeichnung wird nach der Ph.Eur. nun in umgekehrter Schreibweise angegeben, wobei diese bei Safran auch inhaltlich abgewandelt wurde (*Croci stigma* statt *Croci flos*, bzw. *Calami tinctura*). Die frühere ÖAB-Bezeichnung wird als Synonym beibehalten.

Monographie Kalmustinktur (Calami tinctura, Tinctura Calami):

Bei dieser Monographie neu hinzugefügt wurde eine Definition der Ausgangsmaterialien der Drogenzubereitung sowie eine Angabe des Maximalgehalts an β -Asaron, welche beide unter der Rubrik „Definition“ geführt werden. Der Punkt „Bereitung“ wird in „Herstellung“ umbenannt sowie inhaltlich verallgemeinert. Statt „Beschreibung“ bezeichnet nun die Überschrift „Eigenschaften“ eine reduzierte Beschreibung der Kalmustinktur sowie deren Mischbarkeit. Die obsoleete Methode der „Prüfung auf Identität“ mittels nach Verdünnung durchgeführter Geruchs- und Geschmacksprüfung wird durch eine Dünnschichtchromatographie ersetzt. Im Bereich der „Prüfung auf Reinheit“ wird die Bestimmung der (absoluten) Dichte durch jene der relativen Dichte nach der Ph. Eur. ersetzt. Die weiteren Prüfungen wie Bestimmung des Alkoholgehalts, Prüfung auf Methylalkohol/*iso*-Propylalkohol und Bestimmung des Trockenrückstandes werden hier beibehalten. Darüber hinaus hinzugefügt wird der Reinheitsprüfung noch eine flüssigchromatographische Bestimmung des Maximalgehalts von β -Asaron in der Zubereitung. Als Gehaltsbestimmung dient eine Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl, welche ebenfalls im Monographienvorschlag ergänzend hinzutritt.

Der Begriff „Aufbewahrung“ wird durch die Bezeichnung „Lagerung“ ersetzt und der Unterpunkt Dosierung entfällt gänzlich. Im Anhang werden die zur HPLC verwendeten, noch nicht in die Ph. Eur. aufgenommenen Reagentien α - und β -Asaron angeführt.

Daraus ergibt sich folgender Vorschlag für die neu überarbeitete Monographie von Kalmustinktur:

ÖAB 2010/xxx

Kalmustinktur

Calami tinctura

Tinctura Calami

Definition

Kalmustinktur wird aus **Kalmuswurzelstock (Calami Rhizoma, Radix Calami, ÖAB)** hergestellt.
Gehalt: mindestens 0,3 Prozent ätherisches Öl.

Herstellung

Die Tinktur wird aus 20 Teilen Kalmuswurzel und 100 Teilen Ethanol 70 Prozent *R*, nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Beschreibung:

Bräunlichgelbe Flüssigkeit

Mischbarkeit:

Kalmustinktur ist in verdünntem Alkohol oder der gleichen Menge Alkohol klar löslich; mit Wasser trüb mischbar.

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (Ph. Eur. 2.2.27)

Untersuchungslösung: Kalmustinktur

Referenzlösung: 20 mg Anethol *R* und 20 mg β -Asaron werden in 10 ml Methanol *R* gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R* (5-40 μ m) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R* (2-10 μ m)]

Fließmittel: Toluol *R*; Ethylacetat *R* (93:7; V/V)

Auftragen: 30 μ l [oder 15 μ l] Untersuchungslösung und 10 μ l [oder 5 μ l] Referenzlösung; bandförmig (10mm)

Laufstrecke: 15 cm [oder 8 cm]

Trocknen: an der Luft

Detektion: Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz *R* besprüht und 5-10 Minuten lang bei 105 °C erhitzt bis zur deutlichen Farbentwicklung. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
<div><div></div><div>Anethol: eine violette Zone</div><div></div><div>β-Asaron: eine braunviolette Zone</div><div></div></div>	<div><div>eine blaviolette Zone</div><div></div><div>eine blaviolette Zone</div><div>eine braunviolette Zone</div><div></div><div>eine braunviolette Zone (β-Asaron)</div><div></div><div>eine violette Zone</div></div>
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Relative Dichte: $\rho = 0,897 - 0,907$ (Ph. Eur. 2.2.5)

Alkoholgehalt: Mindestens 65,0 Vol. Prozent (Ph. Eur. 2.9.10)

Methylalkohol/ iso-Propylalkohol: höchstens 0,05 Prozent V/V Methanol und höchstens 0,05 Prozent V/V iso-Propylalkohol (Ph. Eur. 2.9.11)

Trockenrückstand: Mindestens 3,3 Prozent (Ph. Eur. 2.8.16)

β -Asaron: Flüssigchromatographie: Maximal 0,1 Prozent (Ph. Eur. 2.2.29)

Untersuchungslösung: 1,0 g Tinktur werden mit Methanol *R* auf 100,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösung a: 10,0 mg β -Asaron *R* werden mit Methanol *R* zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Methanol *R* zu 100,0 ml ergänzt.

Referenzlösung b: 10,0 mg α -Asaron *R* werden mit Methanol *R* zu 100,0 ml gelöst. 2,0 ml dieser Lösung werden mit Referenzlösung a zu 20,0 ml ergänzt.

*Säule:*¹

- Größe: $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm

- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 μ m)

Mobile Phase: Acetonitril *R*, Wasser *R* (50:50, V/V)

Durchflussrate: $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detektion: Spektrometer bei 303 nm

Einspritzen: 20 μ l

Eignungsprüfung: mindestens 1,2 zwischen den Peaks von β -Asaron und α -Asaron
Falls erforderlich wird der Anteil an Acetonitril in der mobilen Phase geändert.

Der Prozentgehalt an β -Asaron wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 10 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

A_1 = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage der Tinktur in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von β -Asaron *R* in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an β -Asaron in β -Asaron *R*

Gehaltsbestimmung

20,0 g Tinktur werden in einem 1000 ml Rundkolben mit 300 ml Wasser *R* versetzt und so lange destilliert, bis 200 ml Destillat in ein Auffanggefäß übergegangen sind. In einem Scheidetrichter werden 65 g Natriumchlorid *R* im Destillat gelöst. Die Lösung wird 3-mal mit je 30 ml Pentan *R* ausgeschüttelt, mit denen zuvor der bei der Destillation benutzte Kühler und das Auffanggefäß gespült wurden. Die vereinigten Pentanauszüge werden über 3 g wasserfreiem Natriumsulfat *R* getrocknet und in einen im Exsikkator 3 h lang getrockneten 100-ml-Rundkolben filtriert. Natriumsulfat und Filter werden 2-mal mit je 20 ml Pentan *R* gewaschen. Das Lösungsmittel wird in einem Wasserbad von 45 °C abdestilliert. Der letzte Rest Pentan wird durch einen Luftstrom 3 min lang abgeblasen. Der Kolben wird 3 h lang im Exsikkator getrocknet und anschließend gewogen. Das zurückbleibende Öl muss braun-orange sein.

¹ Thermo-Hypersil BDS C18 ist geeignet

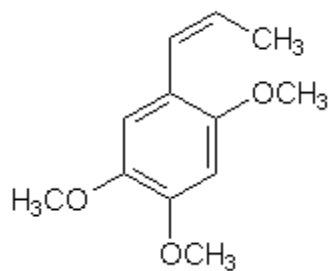
Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

ANHANG

Reagentien

β -Asaron²

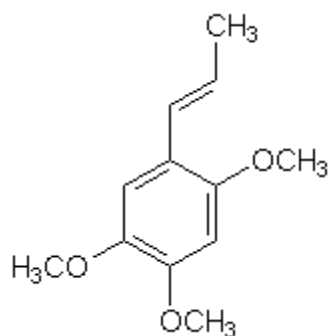


cis- β -Asaron

$C_{12}H_{16}O_3$ $M_r=208,26$

CAS No. 5273-86-9

cis-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(*Z*)-1-propenylbenzol
 α -Asaron³



trans- α -Asaron

$C_{12}H_{16}O_3$ $M_r=208,26$

CAS No. 2883-98-9

trans-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(*E*)-1-propenylbenzol

² Lieferant Phytolab ist geeignet

³ Lieferant Fluka ist geeignet

Monographie Safran (Crocī stigma, Flos Croci)

In der neu erstellten Monographie werden der erste einleitende Satz und der Punkt „Beschreibung“ ersetzt durch die „Definition“, welche eine Beschreibung der verwendeten Pflanzenteile sowie den vorgeschriebenen Gehalt der Droge enthält. Die makroskopischen und mikroskopischen Merkmale aber werden nun in der Rubrik „Prüfung auf Identität“ angeführt und durch Zeichnungen der wichtigsten mikroskopischen Merkmale ergänzt. Dorthin wird auch die abgeänderte Dünnschichtchromatographie aus der Prüfung auf Reinheit verschoben. In der dünnschichtchromatographischen Prüfung wird nun keine nähere Beschreibung der im Chromatogramm der Untersuchungslösung detektierten Zonen (Crocīn, Hydroxycyclocitral und Picrocrocīn) mehr gegeben, da dies nur bei Vorhandensein der selben Inhaltsstoffe in der Referenzlösung erlaubt ist. Unter dem Punkt „Prüfung auf Reinheit“ werden nun nur mehr die Bestimmungen von Trocknungsverlust und Sulfatasche angeführt, die Prüfung des Färbevermögens entfällt. Als Gehaltsbestimmung wird eine HPLC- Methode neu hinzugefügt. Der Begriff „Aufbewahrung“ wird in analoger Weise zur Monographie der Kalmustinktur in „Lagerung“ abgeändert sowie die verwendeten Reagentien im Anhang angeführt.

Daraus ergibt sich folgender Vorschlag für die neu überarbeitete Monographie von Safran:

ÖAB 2010/xxx

Safran **Crocī stigma** ***Flos Croci***

Definition

Safran besteht aus den getrockneten meistens durch ein kurzes Griffelstück zusammengehaltenen Narben von *Crocus sativus* L.

Gehalt: Mindestens xx Prozent Crocīn 1, Crocīn 2 und Picrocrocīn, bezogen auf die getrocknete Droge

Prüfung auf Identität

- A. Die ziegelroten Narben sind in trockenem Zustand 20 bis 40 mm, in nassem Zustand 35 bis 50 mm lang. Die auf einer Seite aufgespaltenen Röhren erweitern sich nach oben. Der obere Rand ist offen und feingezackt. Das, die 3 Narben zusammenhaltende Griffelstück ist blassgelb und höchstens 5 mm lang.
- B. Die Epidermiszellen sind von gestreckter Form und weisen oft im Zentrum eine kurze Papille auf; in Wasser lassen sie einen gelben Farbstoff austreten. Der obere Rand der Narben besitzt fingerartige, bis 150 µm lange Papillen. Zwischen den Papillen finden sich einzelne kugelige

Pollenkörner mit fein getüpfelter Exine. Die Leitbündel enthalten enge Gefäße mit spiraligen Verdickungen.

- C. Die Droge wird pulverisiert (355) (2.9.12). Das Pulver ist ziegelrot.
Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat-Lösung *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Bruchstücke der Narben mit Epidermis in Aufsicht: langgestreckte Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen im Zentrum, sichtbar als halbkreisförmige Gebilde; Bruchstücke des Narbenrands mit kleineren Epidermiszellen und fingerförmigen Papillen; Bruchstücke der Narben im Querschnitt: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen. Weiters sind zu sehen: große, feingetüpfelte Pollenkörner, abgebrochene fingerförmige Papillen, spiralig verdickte Gefäße.

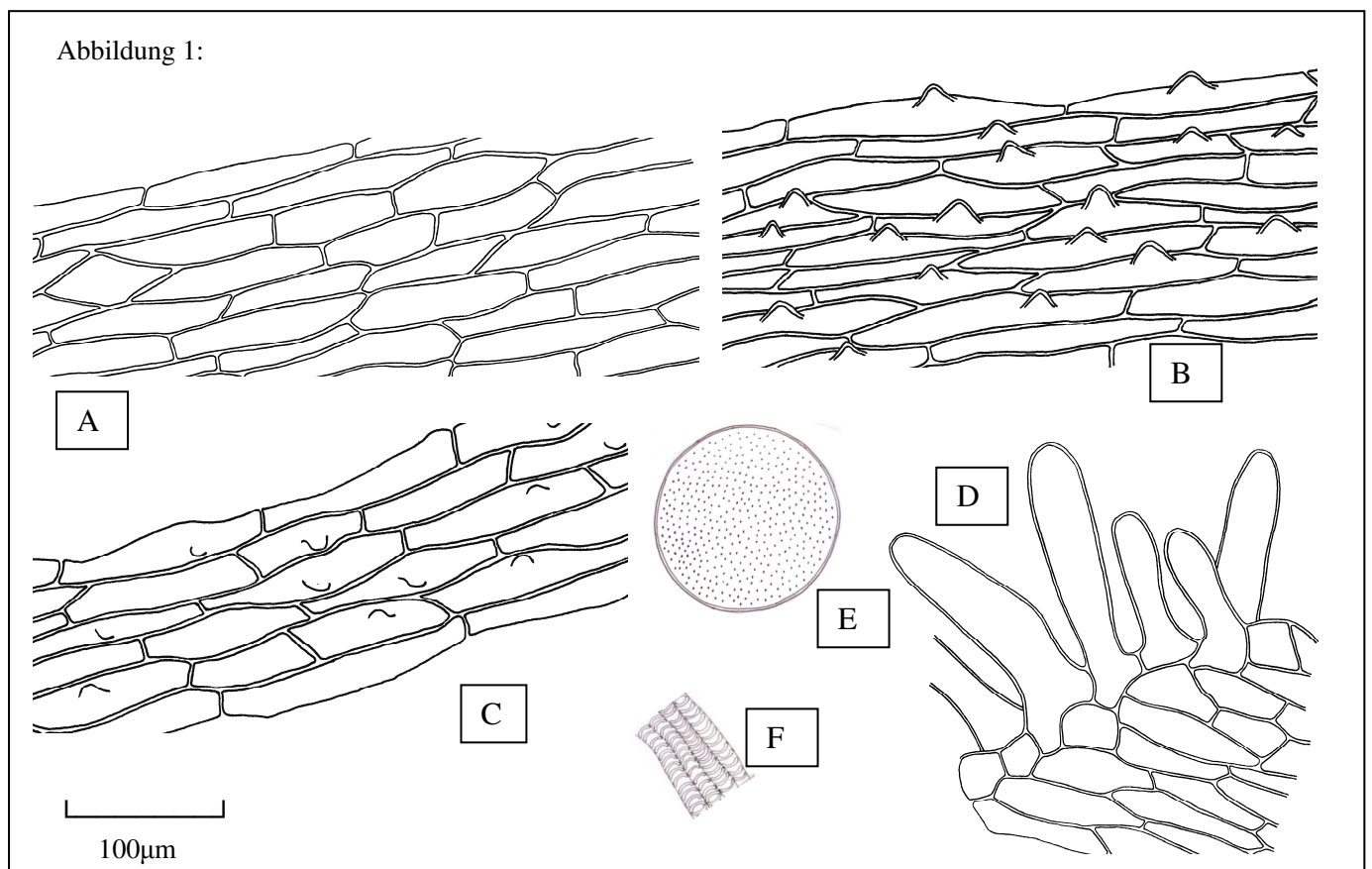


Abbildung 1:

- A: Längliche Epidermiszellen
B: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen; Seitenansicht
C: Epidermiszellen mit wallförmigen Papillen; Aufsicht
D: Narbenrand mit fingerförmigen Papillen
E: Getüpfeltes Pollenkorn
F: Spiralig verdickte Gefäßbündel

Dünnschichtchromatographie (Ph. Eur. 2.2.27)

Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagensglas (60 mm x 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und mit einem Tropfen Wasser benetzt. Nach 2 bis 3 Minuten wird 1 ml Methanol *R* hinzugefügt, 20 Minuten lang unter Lichtausschluss stehen gelassen und anschließend die Lösung filtriert.

Referenzlösung: 5 mg Shikimisäure *R* werden in 5 ml Methanol *R* gelöst. Getrennt werden 5 mg Saccharose *R* werden in 5 ml Wasser *R* gelöst. Die beiden Lösungen werden vereinigt.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5-40µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2-10µm)]

Fließmittel: Ethylacetat R; Isopropanol R; Wasser R ; Ameisensäure R (65/25/10/1;V/V/V/V)

Auftragen: 10 µl Untersuchungslösung; bandförmig (15 mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (7,5 mm)] und 10 µl Referenzlösung; bandförmig (15mm) [oder 2,5 µl; bandförmig (7,5 mm)]

Laufstrecke: 10 cm [oder 7 cm]

Trocknen: an der Luft

Detektion: Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz R besprüht und 5-10 Minuten lang bei 105 °C erhitzt bis zur deutlichen Farbentwicklung. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen ist aus der nachstehenden Abbildung ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
eine dunkelrosa Zone: Shikimisäure	eine violette Zone
	eine schwach blaue Zone
	eine blauviolette Zone
eine graublaue Zone: Saccharose	eine dunkelblaue Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 0.20 g Droge durch Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105 °C bestimmt.

Sulfatasche (2.4.14): höchstens 8,0 Prozent, mit dem Rückstand der vorhergehenden Prüfung bestimmt.

Gehaltsbestimmung:

Flüssigchromatographie (2.2.29): mind. xx Prozent Crocin 1, Crocin 2 und Picrocrocin

Referenz-Lösung: xx mg Crocin 1 R werden in xx ml Ethanol 70 Prozent R gelöst.

Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagensglas (60 mm x 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und in einem 100.0 ml Messkolben mit 50 ml Ethanol 70 Prozent R unter Lichtausschluss und Eiskühlung 20 Minuten auf dem Ultraschallbad extrahiert, anschließend wird mit Ethanol 70 Prozent R auf 100,0 ml aufgefüllt und filtriert.

*Säule:*⁴

- Größe: l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm

- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)

⁴ Thermo-Hypersil BDS 18 ist geeignet

Mobile Phase:

Mobile Phase A: Wasser *R* mit 1 Prozent Essigsäure 99 Prozent *R* (pH 2,8)

Mobile Phase B: Methanol *R*

Zeit (min)	Mobile Phase A (% V/V)	Mobile Phase B (% V/V)
0 – 1	70	30
1 – 6	70 → 55	30 → 45
6 – 20	55 → 25	45 → 75
20 – 25	25 → 10	75 → 90
25 – 30	10	90

Durchflussrate: 1,0 ml · min⁻¹

Detektion: Spektrometer bei 254 nm

Einspritzen: 30 µl

Der Prozentgehalt an Crocin 1 und 2 sowie Picrocrocin wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 10 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

A_1 = Peakfläche von Crocin 1, 2 bzw. Picrocrocin im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Peakfläche von Crocin 1, 2 bzw. Picrocrocin im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage des Safrans in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von Crocin 1, 2 bzw. Picrocrocin in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an Crocin 1, 2 bzw. Picrocrocin in Crocin 1, 2 bzw. Picrocrocin

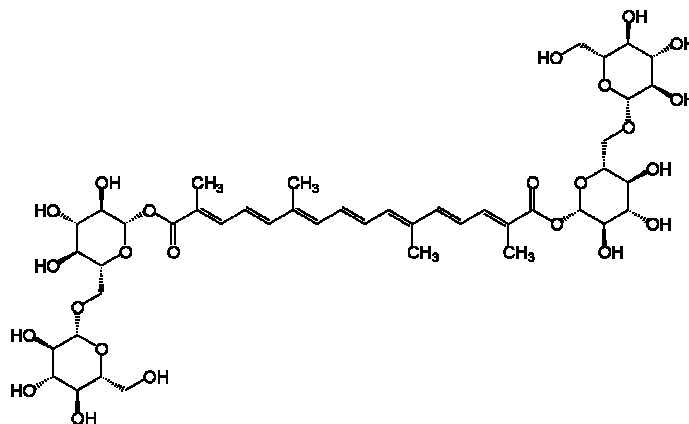
Lagerung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

ANHANG

Reagentien

Crocin 1



C₄₄H₆₄O₂₄ M_r = 976,98

CAS No. 42553-65-1

In den rot markierten Bereiche der Monographie von Safran konnten auf Grund der noch ausstehenden Gehaltsbestimmung noch keine Werte für den Gehalt eingefügt werden, zum besseren Überblick über den Aufbau der Monographie werden die betreffenden Teile jedoch nicht gänzlich weggelassen. Auch der Anhang muss erst nach Abschluss der Arbeiten um die restlichen für die HPLC verwendeten Referenzsubstanzen ergänzt werden.

6. Zusammenfassung

Das nationale österreichische Arzneibuch wurde erstmals 1812 in Wien unter dem Titel *Pharmacopoea Austriaca*, damals noch in lateinischer Sprache, herausgegeben und löste die zahlreichen Provinzial-Pharmakopoen ab. Schon in dieser Ausgabe fand sich eine Erwähnung der hier behandelten Pflanzen Safran und Kalmus, jedoch beschränkt auf die botanische Klassifizierung. In der 4. Ausgabe aus dem Jahr 1836 wurden dann zusätzlich ein wässrig-alkoholischer Extrakt von *Acorus calamus* L., eine Tinktur also, sowie die mögliche Verwendung von Flos Croci in Opiumtinkturen angeführt. Die 6. Ausgabe der *Pharmakopoea Austriaca* (1869) enthielt eine ausführlichere Beschreibung von *Crocus sativus* L. samt einer Warnung vor Verfälschungen.

Kalmustinktur und Safran sind auch heute noch Gegenstand von Monographien des ÖAB. Sie finden traditionell Verwendung in der heimischen Volksmedizin sowie in zahlreichen Medizinsystemen auf der ganzen Welt und waren zudem Gegenstand zahlreicher Studien, die deren Wirksamkeit erforschten und diese in vielen Bereichen belegten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Monographien von Kalmustinktur und Safran aus der amtlichen Ausgabe 2009 des ÖAB grundlegend überarbeitet. Dabei mussten zuerst die vorhandenen Methoden überprüft und notwendigenfalls abgeändert werden. Ziel war die Aktualisierung der Monographien durch Streichung obsoleter Teile und Ergänzung um fehlende Prüfungen.

Es gelang, die Monographie Kalmustinktur in Anlehnung an jene der Kalmuswurzel zu ergänzen. Im Zuge dessen wurde auch eine Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls hinzugefügt, da zuvor nur eine Bestimmung des Maximalgehalts der toxischen Komponente β -Asaron als Reinheitskriterium gefordert war.

Die Monographie Safran bedurfte einer umfassenderen Beschäftigung, da hier sowohl die Dünnschichtchromatographie für die Reinheitsprüfung überarbeitet sowie eine geeignete Methode für die Flüssigchromatographie ausgearbeitet werden musste. Letzteres war zwar möglich, die eigentliche Ermittlung des Gehalts von Crocin 1, Crocin 2 und Picrocrocin ist jedoch auf Grund bis dato nicht gelieferter benötigter Referenzsubstanzen noch ausständig geblieben.

7. Summary

The National Austrian Pharmacopoeia was first published in 1812 in Vienna under the title *Pharmacopoea Austriaca*, then still in Latin, and took the place of the numerous provincial-*Pharmakopoea*. In this edition there was already a reference to saffron and calamus, the plants, dealt with in this work; but it was limited to their botanical classification. In the 4th edition which was issued 1836, an aqueous alcoholic extract of *Acorus calamus* L., i.e. a tincture, as well as the possible use of Flos Croci in opium tincture were mentioned. The 6th edition of the *Pharmakopoea Austriaca* (1869) contained a detailed description of *Crocus sativus* L. including a warning against adulterations.

Calmus tincture and saffron are still subject to ÖAB monographs today. They are traditionally used in Austrian folk medicine as well as in many other medicinal systems all over the world and were also subject to many studies, in which their effectiveness was examined and mostly confirmed.

In this thesis, the monographs of calmus tincture and saffron from the 9th edition of the ÖAB (2009) have been substantially revised. During this work first the existing methods had to be reviewed and were changed if necessary. The aim was to update the monographs by deleting obsolete parts and providing new tests.

The monograph of calmus tincture was changed following the ÖAB monograph of “Kalmuswurzel” (calmus roots) and thus successfully completed. In this course an assay of the essential oil content was added, since previously only the determination of the toxic component β -asarone had been required.

The monograph of saffron demanded more alterations, since thin layer chromatography in the tests section as well as an appropriate method for the liquid chromatography were needed. Eventually, the latter was possible, but the investigation of the content of Crocin 1, Crocin 2 and Picrocrocin is yet missing due to problems in the delivery of the required reference substances.

8. Literatur

- ♦ Abdullaev F. I. (1994), Inhibitory effect of Crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells, *Toxicol. Lett.* **70**: 243 – 251.
- ♦ Abdullaev F. I. (2002), Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.), *Exp. Biol. Med.* **227**: 20 – 25.
- ♦ Abe K., Sugiura M., Shoyama Y., Saito H. (1998), Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons, *Brain Res.* **787**: 132 – 138.
- ♦ Abe K. und Saito H. (2000), Effects of Saffron Extract and its Constituent Crocin on Learning Behaviour and Long-term Potentiation, *Phytother. Res.* **14**: 149-152.
- ♦ Ahmad A. S., Ansari M. A., Ahmad M., Saleem S., Yousuf S., Hoda M. N., Islam F. (2005), Neuroprotection by Crocetin in a hemi-parkinsonian rat model, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81**: 805-813.
- ♦ Akhondzadeh S., Fallah-Pour H., Afkham K., Jamshidi A.-H., Khaligi-Cigaroudi F. (2004), Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: A pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816], *BMC Complement. Altern. Med.* **4**: 12.
- ♦ Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Noorbala A.-A., Amini H., Fallah-Pour H., Jamshidi A.-H., Khani M. (2005), *Crocus sativus* L. in the Treatment of Mild to Moderate Depression: A Double-blind, Randomized and Placebo-controlled Trial, *Phytother. Res.* **19**: 148-151.
- ♦ Akhondzadeh S., Sabet M. S., Harirchian M. H., Togha M., Cheraghmakani H., Razeghi S., Hejazi S. S., Yousefi M. H., Alimardani R., Jamshidi A., Rezazadeh S.-A., Yousefi A., Zare F., Moradi A., Vossoughi A. (2010), A 22-week, multicenter, randomized, double-blind controlled trial of *Crocus sativus* in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease, *Psychopharmacology* **207**: 637-643.
- ♦ Assimopoulou A. N., Sinakos Z., Papageorgiou V. P. (2005), Radical Scavenging Activity of *Crocus sativus* L. Extract and its Bioactive Constituents, *Phytother. Res.* **19**: 997 - 1000
- ♦ Aung H. H., Wang C. Z., Ni M., Fishbein A., Mehendale S. R., Xie J. T., Shoyama C. Y., Yuan C. S. (2007), Crocin from *Crocus sativus* possesses significant antiproliferation effects on human colorectal cancer cells, *Exp. Oncol.* **29**: 175 – 180.
- ♦ Basti A. A., Moshiri E., Noorbala A.-A., Jamshidi A.-H., Abbasi S. H., Akhondzadeh S. (2007), Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of

- depressed outpatients: A pilot double-blind randomized trial, *Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**: 439 – 442.
- ♦ Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V. (2007), *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
 - ♦ Blaschek W., Frohne D., Löw D. in Wichtl M. *Teedrogen und Phytopharmaka*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009
 - ♦ Chen C., Spriano D., Meier B. (2009), Reduction of β -Asarone in *Acori Rhizoma* by Decoction, *Planta Med* **75**: 1448-1452.
 - ♦ Das I., Das S., Saha T. (2010), Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: A histopathological study, *Acta Histochem.* **112**: 317 – 327.
 - ♦ Deupree D. L., Turner D. A., Watters C. L. (1991), Spatial performance correlates with *in vitro* potentiation in young and aged Fischer 344 rats, *Brain Res.* **554**: 1 – 9.
 - ♦ Europäisches Arzneibuch, Amtliche österreichische Ausgabe 6.0, 2009.
 - ♦ Feizzadeh B., Afshari J. T., Rakhshandeh H., Rahimi A., Brook A., Doosti H. (2008), Cytotoxic Effect of Saffron Stigma Aqueous Extract on Human Transitional Cell Carcinoma and Mouse Fibroblast, *Urol. J.* **5**: 161 – 167.
 - ♦ Gu Q., Du H., Ma C., Fotis H., Wu B., Huang C., Schwarz W. (2010), Effects of α -Asarone on the Glutamate Transporter EAAC1 in *Xenopus* Oocytes, *Planta Med* **76**: 595-598.
 - ♦ Hänsel R., Sticher O. (Hrsg.) (2009), *Pharmakognosie Phytopharmazie*, 9. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
 - ♦ Hazra R., Ray K., Guha D. (2007), Inhibitory role of *Acorus calamus* in ferric chloride-induced epileptogenesis in rat, *Hum. Exp. Toxicol.* **26**: 947-953.
 - ♦ He S.-Y., Qian Z.-Y., Wen N., Tang F.-T., Xu G.-L., Zhou C.-H. (2007), Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails, *Eu. J. Pharmacol.* **554**: 191 – 195.
 - ♦ Hebb D. O. (1949), *The Organization of Behaviour*, Wiley, New York
 - ♦ Hensel A., Rösing M. (2003) *Crocus*, in Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J. (Hrsg.), *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*, Springer Electronic Media, Heidelberg.
 - ♦ Hiller K., Löw D. in Wichtl M. *Teedrogen und Phytopharmaka*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009.

- ♦ Hosseinzadeh H. und Talebzadeh F. (2005), Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice, *Fitoterapia* **76**: 722-724.
- ♦ Hosseinzadeh H. und Sadeghnia H. R. (2007), Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems, *Phytomedicine* **14**: 256-262.
- ♦ Hosseinzadeh H. und Jahanian Z. (2009), Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) Stigma and its Constituents, Crocin and Safranal, on Morphine Withdrawal Syndrome in Mice, *Phytother. Res.* **24**: 726-730.
- ♦ Hosseinzadeh H. und Noraei N. B. (2009), Anxiolytic and Hypnotic Effect of *Crocus sativus* Aqueous Extract and its Constituents, Crocin and Safranal, in Mice, *Phytother. Res.* **23**: 768-774.
- ♦ Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch (2004), 9.Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin
- ♦ Jain N., Jain R., Jain A., Jain D. K., Chandel H. S. (2010), Evaluation of wound-healing activity of *Acorus calamus* Linn., *Nat. Prod. Res.* **24**: 534-541.
- ♦ Kanakis C. D., Tarantilis P. A., Tajmir-Riahi H.-A., Polissiou M. G. (2007), DNA Interaction with Saffron's Secondary Metabolites Safranal, Crocetin, and Dimethylcrocetin, *DNA and Cellbiology* **26**: 63 – 70.
- ♦ Karimi G., Hosseinzadeh H., Khaleghpanah P. (2001), Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* in mice, *Iranian Basic Med Sci* **4**: 11-15.
- ♦ Laroche S., Doyere V., Bloch V. (1989), Linear relation between the magnitude of long-term potentiation in the dentate gyrus and associative learning in the rat. A demonstration using commissural inhibition and local infusion of an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, *Neuroscience* **28**: 375 – 386.
- ♦ Lech K., Witowska-Jarosz J., Jarosz M. (2009), Saffron yellow: characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection, *J. Mass. Spectrom.* **44**: 1661 – 1667.
- ♦ Lechtenberg M., Schepmann D., Niehues M., Hellenbrand N., Wunsch B., Hensel A. (2008), Quality and Functionality of Saffron: Quality Control, Species Assortment and Affinity of Extract and Isolated Saffron Compounds to NMDA and σ_1 (Sigma-1) Receptors, *Planta Med* **74**: 764 – 772.
- ♦ Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M. (1986), Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5, *Nature* **319**: 774 – 776.

- ♦ Moshiri E., Basti A. A., Noorbala A.-A., Jamshidi A.-H., Abbasi S. H., Akhondzadeh S. (2006), *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial, *Phytomedicine* **13**: 607 – 611.
- ♦ Mukherjee P. K., Kumar V., Mal M., Houghton P. J. (2007), *In vitro* Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of the Essential Oil from *Acorus calamus* and its Main Constituents, *Planta Med* **73**: 283-285.
- ♦ Nair S. C., Salomi M. J., Pannikar K. R. (1991), Modulatory effects of the extract of saffron and *Nigella sativa* against cisplatinum induced toxicity in mice, *J. Ethnopharmacol.* **31**: 75 – 83.
- ♦ Nair S. C., Salomi M. J., Varghese C. D., Pannikar B., Pannikar K. R. (1992), Effect of saffron on thymocyte proliferation, intracellular glutathione levels and its antitumor activity, *BioFactors* **4**: 51 – 54.
- ♦ Noorbala A. A., Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Jamshidi A. H. (2005), Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial, *J. Ethnopharmacol.* **97**: 281-284.
- ♦ ÖAB, Amtliche Ausgabe 2009, Verlag Österreich, Wien.
- ♦ ÖAB, Amtliche Ausgabe 2010, Verlag Österreich, Wien.
- ♦ Ozben T. (2007), Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy, *J. Pharm. Sci.* **96**: 2181 – 2196.
- ♦ Papandreou M. A., Kanakis C. D., Polissiou M. G., Efthimiopoulos S., Cordopatis P., Margarity M., Lamari F. N. (2006), Inhibitory Activity on Amyloid- β Aggregation and Antioxidant Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract and Its Crocin Constituents, *J. Agric. Food Chem.* **54**: 8762-8768.
- ♦ Pharmakopoea Austriaca (1836), Wien, 4. Auflage.
- ♦ Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China (2005), Peoples Medical Publishing House, Beijing, English ed., Vol. 1.
- ♦ Pitsikas N. und Sakellaridis N. (2006), *Crocus sativus* L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat, *Behav. Brain Res.* **173**: 112-115.
- ♦ Pitsikas N., Zisopoulou S., Tarantilis P. A., Kanakis C. D., Polissiou M. G., Sakellaridis N. (2007), Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory, *Behav. Brain Res.* **183**: 141-146.

- ♦ Pitsikas N., Boultsadakis A., Georgiadou G., Tarantilis P. A., Sakellaris N. (2008), Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety, *Phytomedicine* **15**: 1135 – 1139.
- ♦ Prawitt J. (2006), Entwicklung eines Adipozytenmodells aus einer humanen mesenchymalen Stammzelllinie und dessen molekulare und funktionale Charakterisierung, Dissertation, Univ. Hamburg.
- ♦ Ramirez O. A., Orsingher O. A., Carrer H. F. (1988), Differential threshold for long-term potentiation in the hippocampus of rats with inborn high or low learning capacity, *Neurosci. Lett.* **92**: 275 – 279.
- ♦ Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. (2008), *Biochemie*. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- ♦ Schmidt M., Betti G., Hensel A. (2007), Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses, *Wien Med Wochenschr* **157/13-14**: 315-319.
- ♦ Shah A. J., Gilani A. H. (2009), Blood pressure-lowering and vascular modulator effects of *Acorus calamus* extract are mediated through multiple pathways, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**: 38-46.
- ♦ Si M.-M., Lou J.-S., Zhou C.-X., Shen J. N., Wu H.-H., Yang B., He Q.-J., Wu H.-S. (2010), Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* *in vitro* and *in vivo*, *J. Ethnopharmacol.* **128**: 154-159.
- ♦ Silva A. J., Raylor R., Wehner J. M., Tonegawa S. (1992), Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice, *Science* **257**: 206 – 211.
- ♦ Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Abe K. (1994), Crocin (crocin digentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 703 – 707.
- ♦ Tarantilis P. A., Morjani H., Polissiou M., Manfait M. (1994), Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukaemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L., *Anticancer Res.* **14**: 1913 – 1918.
- ♦ Tavakkol-Afshari J., Brook A., Mousavi S. H. (2008), Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines, *Food Chem. Toxicol.* **46**: 3443 – 3447.
- ♦ The United States Pharmacopoeia – The National Formulary (2008), The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 32. Auflage – 27. Auflage.
- ♦ Wagner H., *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe* (1999), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 6. Auflage, Band 2.

- ♦ Wang Y., Han T., Zhu Y., Zheng C.-J., Ming Q.-L., Rahman K., Qin L.-P. (2010), Antidepressant properties of bioactive fractions from the extract of *Crocus sativus* L., J. Nat. Med. **64**: 24 – 30.
- ♦ Watanabe Y., Himi T., Saito H., Abe K. (1992), Involvement of glycine site associated with the NMDA receptor in hippocampal long-term potentiation and acquisition of spatial memory in rats, Brain Res. **582**: 58 – 64.
- ♦ Wu H.-S., Li Y.-Y., Weng L.-J., Zhou C.-X., He Q.-J., Lou Y.-J. (2007), A Fraction of *Acorus calamus* L. Extract Devoid of β -asarone Enhances Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells, Phytother. Res. **21**: 562-564.
- ♦ Wu H. S., Zhu D. F., Zhou C. X., Feng C. R., Lou Y. J., Yang B., He Q.J. (2009), Insulin sensitizing activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* L. in vitro and in vivo, J. Ethnopharmacol. **123**: 288-292.
- ♦ Zhang Y., Shoyama Y., Sugiura M., Saito H. (1994), Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performance in mice, Biol. Pharm. Bull. **17**: 217-221.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - <i>Acorus calamus</i> L.	9
Abbildung 2 - Kalmuswurzel getrocknet und geschnitten	10
Abbildung 3 - Kalmustinktur	10
Abbildung 4 – Dünnschichtchromatographie von Kalmustinktur nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis; System aus ÖAB 2010 Monographie Kalmuswurzel	20
Abbildung 5 – Dünnschichtchromatographie von Kalmustinktur nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System aus ÖAB 2010 Monographie Kalmuswurzel	20
Abbildung 6 - HPLC-Chromatogramm der Referenz a (1 mg β -Asaron in 100 ml Methanol R) zu Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1	27
Abbildung 7 - HPLC-Chromatogramm der Referenz b (je 1 mg α - und β -Asaron in 100 ml Methanol) zu Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1	27
Abbildung 8 - HPLC-Chromatogramm der Testtinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f, Methode 1	27
Abbildung 9 - HPLC-Chromatogramm der Referenz a (1 mg β -Asaron in 100 ml Methanol R) von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f,	28
Abbildung 10 - HPLC-Chromatogramm der Referenz b (je 1 mg α - und β -Asaron in 100 ml Methanol) zu Probe 1 und 2 von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f	28
Abbildung 11 - HPLC-Chromatogramm der Probe 1a von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f	29
Abbildung 12 - HPLC-Chromatogramm der Probe 2a von Kalmustinktur, Detektion bei 303 nm, Bedingungen siehe S. 25f	29
Abbildung 13 - <i>Crocus sativus</i> L.	33
Abbildung 14 – Safranernte	34
Abbildung 15 - Safransammlerinnen auf der Wandmalerei von Akrotiri, späte Bronzezeit	36
Abbildung 16 - Safran getrocknet	47
Abbildung 17 - Safran - langgestreckte Epidermiszellen	48
Abbildung 18 - Safran - wallförmige Papillen	48
Abbildung 19 - Safran - Narbenrand mit fingerförmigen Papillen	48
Abbildung 20 - Safran - getüpfeltes Pollenkorn	48
Abbildung 21 - Safran - Spiralgefäße	48
Abbildung 22 – Aufnahmen von Safran - wallförmige Papillen	49
Abbildung 23 – Aufnahmen von Safran - fingerförmige Papillen	49
Abbildung 24 – Aufnahme von Safran - getüpfeltes Pollenkorn	50
Abbildung 25 – Aufnahme von Safran - Spiralgefäße	50
Abbildung 26 – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Sudanrot; Vis, System 1 (siehe S. 50f)	52
Abbildung 27 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit verschiedenen Pflanzensäuren als Referenzsubstanzen; UV 254 nm, System 1 (siehe S. 50f)	53
Abbildung 28 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit stark polaren Referenzsubstanzen; UV 366 nm, System 1 (siehe S. 50f)	54
Abbildung 29 A – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Naphtholgelb und Saccharose; Vis, System 1 (siehe S. 50f)	55
Abbildung 30 – Dünnschichtchromatographie von Safran mit den Referenzen Saccharose und Shikimisäure, nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens; Vis, System 2 (siehe S. 52)	56
Abbildung 31 – Färbevermögen von Safran - Vergleich von Safranextrakt (links) mit 0,05-prozentiger Kaliumdichromatlösung (rechts)	57
Abbildung 32 - HPLC-Chromatogramm der Probe 1b von Safran, Detektion bei 254 nm, Bedingungen siehe S. 60	61
Abbildung 33 - Monographie Kalmustinktur	II
Abbildung 34 - Monographie Kalmuswurzel	IV
Abbildung 35 - Monographie Safran	VI

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1 - Herkunft der Proben von Kalmustinktur</i>	3
<i>Tabelle 2 - Herkunft der Proben von Kalmuswurzel</i>	3
<i>Tabelle 3 – Probennummern von Kalmustinkturen</i>	4
<i>Tabelle 4 - Herkunft der Proben von Safran</i>	4
<i>Tabelle 5 – Probennummern von Safran</i>	4
<i>Tabelle 6 – HPLC-Module für die Analyse von Kalmustinktur</i>	7
<i>Tabelle 7 – HPLC-Module für die Analyse von Safran</i>	7
<i>Tabelle 8 - Typische Inhaltsstoffe der Kalmuswurzel</i>	13
<i>Tabelle 9 – Bestimmung von Absoluter und Relativer Dichte der Kalmustinkturproben 1-5 – Ergebnisse</i>	22
<i>Tabelle 10 – Bestimmung des Alkoholgehalts der Kalmustinkturproben 1-5 - Ergebnisse</i>	24
<i>Tabelle 11 – Bestimmung des Trockenrückstands der Kalmustinkturproben 1-5 – Ergebnisse</i>	25
<i>Tabelle 12 - Einwaagen der Kalmustinkturproben 1-5 und β-Asaron in der Referenzlösung zur Bestimmung des Gehalts an β-Asaron in Kalmustinktur mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f.</i>	29
<i>Tabelle 13 - Retentionszeiten und Peakflächen von Referenz- und Untersuchungslösungen der Kalmustinkturproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f.</i>	30
<i>Tabelle 14 – Gehalt an β-Asaron der Kalmustinkturproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 25f.</i>	30
<i>Tabelle 15 – Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl der Kalmustinkturproben 1-5 - Ergebnisse</i>	32
<i>Tabelle 16 - Hauptinhaltsstoffe von Safran</i>	38
<i>Tabelle 17 – Bestimmung des Trocknungsverlustes der Safranproben 1-5 – Ergebnisse</i>	58
<i>Tabelle 18 – Bestimmung der Sulfatasche der Safranproben 1-5 – Ergebnisse</i>	59
<i>Tabelle 19 – Fließmittelgradient für die HPLC-Untersuchung von Safran nach Wang et al. (2010)</i>	60
<i>Tabelle 20 - Retentionszeiten und Peakflächen von Crocin 1 in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60.</i>	62
<i>Tabelle 21 - Retentionszeiten und Peakflächen von Crocin 2 in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60.</i>	62
<i>Tabelle 22 - Retentionszeiten und Peakflächen von Picrocrocin in den Untersuchungslösungen der Safranproben 1-5, ermittelt mittels HPLC, Bedingungen siehe S. 60</i>	62

Chinesisches Arzneibuch**Stigma Croci****(Xihonghua)**

Saffron

Saffron is the dried stigma of *Crocus sativus* L.

(Fam. Iridaceae)

Description Linear, 3-branched, about 3 cm long, dark red, the upper part broader and slightly flattened, the margin of apex irregularly dentate, with a short slit at the inner side, sometimes a small piece of yellow style remained at the lower end. Texture light, lax and soft, without oily lustre, brittle and short after drying. Odour, characteristic, slightly irritant; taste, slightly bitter.

Identification (1) Powder: Orange-red. Epidermal cells long stripe-shaped in surface view, thin-walled, slightly sinuous, sometimes the outer walls protruding and showing papillae, with indistinct fine striations. Terminal epidermal cells of stigma papillated, 26-56 µm in diameter, with sparse striations on surface. Parenchymatous cells crowded with crystals of calcium oxalate, granular, round-fascicled, fusiform or subsquare, 2-14 µm in diameter.

(2) Macerate a small quantity of drug in water, the orange-yellow colour descends vertically and diffuses slowly, while the solution is yellow without precipitation. Stigma looks like a loudspeaker with short chink which is not broken in a short time when picked with a needle.

(3) Place small quantity of the drug on a white porcelain plate, add 1 drop of sulphuric acid, a blue to purple colour is produced, which turns to reddish-brown or brown gradually.

(4) Measure the absorbance of solution obtained under the test of Absorbance at 458 nm (Appendix V A), the ratio of the absorbance at 458 nm to that at 432 nm is 0,85 to 0,90.

(5) to 20 mg of the powder add 1 ml of methanol, ultrasonicate for 10 minutes, allow to stand until clear and use the supernatant as the test solution. Prepare a solution of 20 mg of Stigma Croci reference drug in the same manner as the reference drug solution. Carry out the method for thin-layer chromatography (Appendix VI B), using silica gel G as the coating substance and a mixture of ethyl acetate methanol-water (100:16,5:13,5) as the mobile phase. Apply separately to the plate 3-5 µl of each of the above two solutions. After developing and removal of the plate, dry in air, examine under daylight and ultraviolet light at 365 nm. The spots or fluorescent spots in the chromatogram obtained with the test solution correspond in position and colour to the spots obtained with the reference drug solution (Protected from light).

Loss on drying Dry 2 g at 105°C for 6 hours, loses not more than 12 per cent (Appendix IX G).

Total ash Not more than 7,5 per cent (Appendix IX K).

Acid-insoluble ash Not more than 1,5 per cent (Appendix IX K).

Absorbance Dry the drug in vacuum desiccator over silica gel for 24 hours and grind into fine powder. Weigh accurately 30 mg into a Soxhlet's extractor, extract with 70 ml of ethanol under reflux and cool. Transfer the extract to a 100 ml volumetric flask, filter, if

necessary. Wash the extractor with methanol, transfer the washings into the volumetric flask, dilute with methanol to volume and mix well. Measure accurately 5 ml to a 50 ml volumetric flask, dilute with methanol to volume and mix well. Carry out the method for ultraviolet spectrophotometry and colourimetry (Appendix V A), measure the absorbance at 432 nm, not less than 0,50.

Extractives Carry out the hot extraction method for determination of ethanol-soluble extractives (Appendix X A), using 30 % ethanol as the solvent, not less than 55 per cent.

Assay Operate protected from light. Carry out the method for high performance liquid chromatography (Appendix VI D).

Chromatographic system and system suitability Use octadecylsilane bonded silica gel as the stationary phase and a mixture of methanol and water (45:55) as the mobile phase. As detector a spectrophotometer set at 440 nm. The number of theoretical plates of the column is not less than 3500, calculated with reference to the peak of Crocin-I.

Reference solution Weigh accurately a quantity of Crocin-I CRS and Crocin-II CRS, add dilute ethanol to produce the solutions of 30 µg per ml and 12 µg per ml, respectively.

Test solution Weigh accurately 10 mg of the powder (through No. 3 sieve) in a 50 ml amber coloured volumetric flask, add the quantity of dilute ethanol TS, ultrasonicate in the ice bath for 20 minutes; allow to stand cool, add dilute ethanol TS to volume and mix well. Filter and use the successive filtrate as the test solution.

Procedure Inject accurately 10 µl of each of the two solutions into the column and calculate the content.

It contains not less than 10,0 per cent of the total amount of Crocin-I (C₄₄ H₆₄ O₂₄) and Crocin-II (C₃₈ H₅₄ O₁₉), calculated with reference to the dried drug.

Action To activate blood circulation and eliminate blood stasis, remove heat from blood and counteract toxicity, and calm the nerves.

Indications Amenorrhea with abdominal mass formation; blood stasis after childbirth; eruptions in infectious diseases; emotional dejection, mania.

Usage and dosage 3-9 g.

Precaution Used with caution in pregnancy.

Storage Preserve in tightly closed containers, stored in a cool and dry place, protected from light.

ÖAB**2) b) ξ) Bestimmung des Verdampfungsrückstandes und des Trockenrückstandes**

Als Verdampfungs- bzw. Trockenrückstand wird im Arzneibuch jener Rückstand bezeichnet, der nach dem Verdampfen oder Trocknen einer Flüssigkeit oder eines festen Stoffes bei 103 – 105° verbleibt, sofern bei den einzelnen Artikeln keine andere Angabe gemacht wird.

Die Bezeichnung „Verdampfungsrückstand“ wird bei Flüssigkeiten gebraucht, die in reinem Zustand keinen Rückstand hinterlassen; die Bezeichnung „Trockenrückstand“ wird gebraucht, wenn der Rückstand von regulären Bestandteilen des Produkts herrührt.

Die für die Bestimmung verwendeten Wägegläschen müssen vor der Benützung bei der gleichen Temperatur, bei der die Bestimmung ausgeführt wird, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden.

Zur Bestimmung werden 3,0000 – 5,0000 g oder die jeweils angegebene Menge eines festen Stoffes oder einer Flüssigkeit in einem weithalsigen Wägegläschen von etwa 50 mm Durchmesser abgewogen, auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft und dann, wenn nicht anders angegeben, bei 103 – 105° im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man lässt das Wägegläschen im Exsikkator erkalten und wägt.

Bei Tinkturen und Fluidextrakten verwendet man zweckmäßigerweise ein Wägegläschen mit mehrfach gefalteter Filtrierpapiereinlage, das bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Man lässt die Flüssigkeit von dem Filtrierpapier aufsaugen und führt das Eindampfen und Trocknen dann in der oben angegebenen Weise durch.

5) Bestimmung der Dichte

Die Dichte (bei 20° ρ , sonst ρ_t) eines homogenen Körpers ist der aus seiner Masse und seinem Rauminhalt gebildete Quotient. Im Arzneibuch ist die Dichte in Gramm je Milliliter angegeben, 1 Milliliter ist der Raum, den 1 Gramm Wasser, gewogen im Vakuum, bei 4° einnimmt.

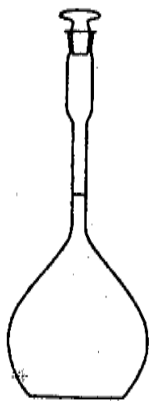
a) Bestimmung mit dem Pyknometer

Abb. 18

Zur Verwendung kann ein Pyknometer beliebiger Form, z.B. das in Abb. 18 dargestellte, kommen.

Zunächst stellt man das Volumen des Pyknometers bei 20° fest, indem man es einmal in leerem Zustand und dann, mit Wasser von 20° gefüllt, wägt. Aus dem so ermittelten Wassergewicht ergibt sich das Volumen (v) des Pyknometers bei 20° nach der Formel:

$$V = (a - p) / 0,997$$

a = Gewicht des mit Wasser gefüllten Pyknometers

p = Gewicht des leeren Pyknometers

Das Volumen des Pyknometers ist eine Apparatkonstante und braucht,

einmal bestimmt, nur gelegentlich nachgeprüft werden.

Bei Verwendung von geeichten Pyknometern erübrigt sich die Bestimmung des Volumens. Zur Ausführung der Bestimmung der Dichte einer Flüssigkeit wird das Pyknometer zuerst leer und hierauf mit der zu untersuchenden Flüssigkeit von 20° gefüllt, gewogen.

Die Dichte (ρ) der Flüssigkeit ergibt sich nach folgender Formel:

$$\rho = (b - p) / v + K$$

b = Gewicht des gefüllten Pyknometers

p = Gewicht des leeren Pyknometers

v = Volumen des Pyknometers

K = Korrekturfaktor für den Auftrieb in Luft (nach folgender Tabelle einzusetzen)

ρ	K
0,60 – 1,03	0,0011
1,04 – 1,72	0,0010
1,73 – 2,00	0,0009

Der Korrekturfaktor kann weggelassen werden, wenn die geforderte Genauigkeit der Bestimmung die Unsicherheit der dritten Dezimalstelle zulässt.

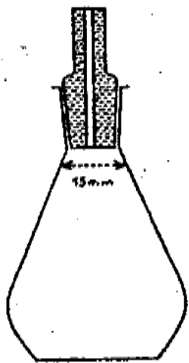


Abb. 19

Die Einstellung auf 20° ist so vorzunehmen, dass man zuerst das mit Wasser bzw. der zu prüfenden Flüssigkeit mindestens 30 Minuten lang in ein Wasserbad von 19,8 – 20,2° eintaucht und hierauf, ohne das Gefäß aus dem Bad herauszunehmen, den Flüssigkeitsspiegel durch Absaugen mit einem Filterpapierröllchen genau auf die Marke einstellt. Sodann wird das Pyknometer aus dem Bad herausgenommen, sorgfältig abgetrocknet und gewogen.

Zur Ermittlung der Dichte von besonders dickflüssigen Substanzen verwendet man ein Pyknometer vom etwa 10 ml Fassungsvermögen (Abb. 19), mit kurzem, etwa 10 – 15 mm weitem Hals, in den ein Glasstopfen eingeschliffen ist, der in der Längsrichtung eine durchgehende kapillare Bohrung besitzt.

Das Volumen des Pyknometers wird in der oben angegebenen Weise bestimmt, nur füllt man es dabei vollständig mit Wasser, dessen Temperatur 2 – 3° unter der Zimmertemperatur liegt. Bei der Angleichung der Temperatur wird durch die Kapillare austretendes Wasser abgewischt, dann wird das Gefäß abgetrocknet und gewogen.

Zur Ausführung der Bestimmung wird zunächst das Gewicht des leeren Pyknometers (p), dann das Gewicht des höchstens zu $\frac{3}{4}$ mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllten Pyknometers (b) ermittelt. Hierauf füllt man den noch leeren Raum des Gefäßes mit Wasser und bestimmt nach Temperaturangleichung neuerdings das Gewicht (c).

Die Dichte der Flüssigkeit ergibt sich nach der Formel:

$$\rho = (b - p) \cdot 0,997 / [0,997 \cdot v - (c - b)]$$

Eine Berücksichtigung der Auftriebskorrektur ist in diesem Fall nicht erforderlich.

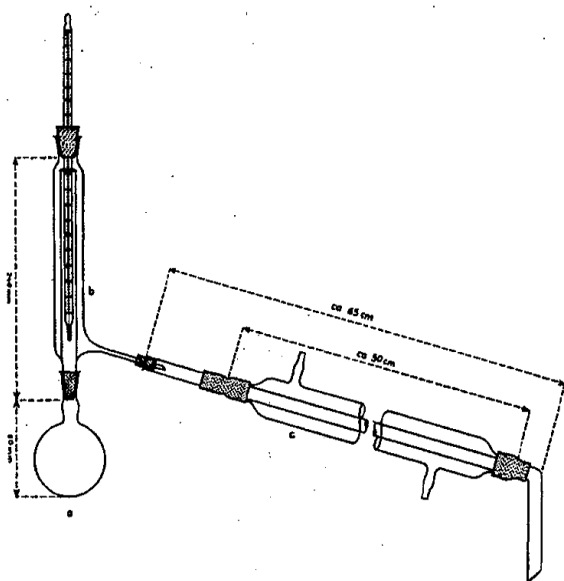
Zur Ermittlung der Dichte von Cera alba und Cera flava verfährt man in der gleichen Weise wie bei der Bestimmung der Dichte von besonders dickflüssigen Substanzen, wobei man jedoch zuerst das Pyknometer zu etwa $1/4 - 1/3$ mit der geschmolzenen Substanz füllt und, sobald die Schmelze frei von Luftblasen ist, erstarren lässt. Hierauf füllt man den noch leeren Raum des Gefäßes mit Wasser und verfährt weiterhin in der oben beschriebenen Weise.

7. Bestimmung des Alkoholgehaltes

Als Alkoholgehalt wird im Arzneibuch der Gehalt einer Flüssigkeit an Äthylalkohol bezeichnet. Er wird in der Regel in Volumprozent (V/V) angegeben.

Zur Bestimmung werden, wenn nicht anders vorgeschrieben, 20,00 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit von 20° in einem 150 ml fassenden Rundkolben eingemessen. Man fügt 30 ml Wasser und einige Siedesteinchen hinzu, destilliert unter der Verwendung des für die Bestimmung des Siedepunktes (ÖAB.: XI, 4) vorgeschriebenen Fraktionieraufsatzes und Liebigkühlers und fängt das Destillat in einem 50 ml fassenden Messkolben auf. Die Destillation kann als beendet angesehen werden, wenn man ungefähr 40 ml Destillat erhalten hat oder wenn keine Flüssigkeit mehr übergeht. Bei stark schäumenden Flüssigkeiten fügt man einen Tropfen Silikon-Antischaumemulsion *R* hinzu. Nach Umschütteln und Einstellen des Destillates auf eine Temperatur von 20° wird mit Wasser von der gleichen Temperatur bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt. Von dieser Alkohol-Wasser-Mischung bestimmt man die Dichte (ÖAB.: XI, 5) mittels eines Pyknometers oder mit Hilfe der hydrostatischen Waage nach Mohr-Westphal. Aus ÖAB.: XXX kann der Gehalt des Destillates an Äthylalkohol in Gewichtsprozent abgelesen werden. Mit Hilfe von ÖAB.: XXXI erfolgt die Umwandlung von Gewichtsprozent in Volumprozent. Durch Multiplikation mit 2.5 erhält man die Volumprozent Äthylalkohol in der untersuchten Flüssigkeit.

Apparatur aus ÖAB.: XI, 4:



Tinctura Calami

Kalmustinktur

Bereitung

Kalmuswurzel (IV)	20 Teile
Verdünnter Äthylalkohol	100 Teile

werden nach dem Mazerationsverfahren (ÖAB.: VI) zur Tinktur verarbeitet.

Beschreibung

Bräunlichgelbe Flüssigkeit, die nach Kalmuswurzel riecht und schmeckt.

Mischbarkeit: Kalmustinktur ist mit verdünntem Alkohol oder mit der gleichen Menge Alkohol klar, mit Wasser trüb mischbar.

Prüfung auf Identität

Verdünnt man 1 ml Kalmustinktur mit 500 ml Wasser, so muß noch deutlich der Geruch nach Kalmuswurzel wahrnehmbar sein.

Prüfung auf Reinheit

Dichte: $\rho = 0,895 - 0,905$ (ÖAB.: XI, 5).

Alkoholgehalt: Mindestens 65,0 Vol.% (ÖAB.: XII, 7).

Methylalkohol, iso-Propylalkohol: Wie bei *Tincturae* Ph. Eur. beschrieben.

Trockenrückstand: Mindestens 3,3 % (ÖAB.: XI, 2, b, ζ).

Aufbewahrung

Vor direktem Sonnenlicht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen.

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis: 1,0 g.

Kalmuswurzelstock

Calami rhizoma

Radix Calami

Definition

Kalmuswurzelstock besteht aus dem von Haarwurzeln und Blattresten befreiten, meist der Länge nach gespaltenen, getrockneten, geschälten oder ungeschälten, ganzen oder geschnittenen Wurzelstock von *Acorus calamus* L. (Araceae). Die Ganzdroge enthält mindestens $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ätherisches Öl, die Schnittdroge mindestens $15 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Eigenschaften

Geruch: aromatisch

Geschmack: scharf, schwach bitter

Prüfung auf Identität

A. Die Ganzdroge besteht aus dem bis 2 cm dicken, flachzylindrischem Wurzelstock mit meist leicht elliptischem Querschnitt. Die Oberfläche ist grünlich gelb bis hellbraun und ist längs gestreift, die innen liegenden Gewebeteile sind weißlich gelb. An der morphologischen Unterseite sind die Wurzelansätze als kleine, runde, scharfrandige, hell- bis dunkelbraune Narben in unregelmäßigen Zickzacklinien angeordnet, an der Oberseite und den Flanken sind Blattnarben in Form spitz-dreieckiger oder streifenförmiger, brauner Felder vorhanden. Seitlich sind gelegentlich Schnittstellen von Verzweigungen erkennbar. Im Querschnitt ist bei Lupenbetrachtung das lockere Aerenchym auffällig, die Endodermis ist als durchgehende Linie im Lupenbild gekennzeichnet. Gefäßbündel sind als helle Punkte im Aerenchym erkennbar, sie treten unregelmäßig zerstreut sowohl außerhalb als auch innerhalb der Endodermis auf, direkt innerhalb der Endodermis stark gehäuft. Die Schnittdroge ist gekennzeichnet durch unregelmäßige, weißlich gelbe Rhizomstücke, an deren Oberfläche Wurzel- und Blattnarben zu erkennen sind. Die Fragmente sind von weicher Konsistenz, der Bruch ist kurz und körnig. Vereinzelt können unterhalb der Epidermis grünliche Chlorophyllinlagerungen auftreten. Bei Lupenbetrachtung sind das Aerenchym, die Endodermis und die Gefäßbündel zu erkennen.

Bei der geschälten Droge fehlen die Blattansätze, die Wurzelnarben sind nur mehr andeutungsweise vorhanden. Die Oberfläche ist weißlich-gelb bis ockerfarben.

B. **Querschnitt:** Epidermis kleinzellig, oft derbwandig, Kork nur um Blatt- und Wurzelnarben. Das Grundgewebe des gesamten Rhizoms ist als Aerenchym ausgebildet: große axial gestreckte Hohlräume werden von meist einschichtigen Gewebeplatten umgeben, Sekretzellen mit ätherischem Öl vor allem an den Schnittpunkten der Gewebeplatten, Sekretzellen größer als Parenchymzellen, Zellwand leicht verdickt, Inhalt mit höherem Brechungsindex als umgebendes Medium. Gefäßbündel unregelmäßig über den Querschnitt zerstreut, außerhalb der Endodermis kollateral geschlossen, direkt innerhalb der Endodermis leptozentrisch, im Zentrum des Rhizoms wieder vorwiegend kollateral geschlossen. Besonders in älteren Rhizomen werden die Gefäßbündel von Fasern begleitet, gelegentlich auch von Kristallzellreihen. Zellen der Endodermis dünnwandig. In allen parenchymatischen Zellen kleinkörnige Stärke ($\sim 10 \mu\text{m}$).

Bei der geschälten Droge fehlen Epidermis und Kork.

Längsschnitt: Aufsicht auf die Gewebeplatten: parenchymatische Zellen in axial orientierten, parallelen Reihen, Zellen axial gestreckt, mit zarter Tüpfelung der Zellwand, zwischen den Zellen charakteristische, sehr kleine dreieckige Interzellularen. In den Gefäßbündeln Tracheen mit verschiedensten Zellwandverdickungen (ringförmig, schraubenförmig, leiterförmig, netzartig, getüpfelt), Fasern, gelegentlich Kristallzellreihen.

Pulver: Die Droge wird pulverisiert. Das Pulver ist weißlich gelb.

Prüfung mit Chloralhydratlösung: Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Fragmente des Aerenchyms in Längsansicht, wobei die parenchymatischen, zart getüpfelten Zellen in parallelen Reihen liegen und leicht axial gestreckt sind; zwischen den Zellen kleine, dreieckige Interzellularen; Sekretzellen mit ätherischem Öl größer als Parenchymzellen, kugelig, leicht verdickte Zellwand; Fragmente von Fasern, gelegentlich Kristallzellreihen; Tracheen mit verschiedenen Formen der Zellwandverdickung.

Prüfung mit Wasser (ohne Aufkochen): kleinkörnige Stärke (bis ca. $10 \mu\text{m}$) in allen parenchymatischen Zellen.

C. Dünnschichtchromatographie (2.2.27).

Untersuchungslösung: 1,0 g gepulverte Droge (710) wird mit 10 ml Methanol R 1 min lang zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten abfiltriert.

Referenzlösung: 20 mg Anethol R und 20,0 mg β -Asaron R werden in 10 ml Methanol R gelöst.

Platten: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 μ m) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 μ m)]

Fließmittel: Toluol R, Ethylacetat R (93:7 V/V)

Auftragen: 30 μ l [oder 15 μ l] Untersuchungslösung und 10 μ l [oder 5 μ l] Referenzlösung; bandförmig (10 mm)

Laufstrecke: 15 cm [oder 8 cm]

Trocknen: an der Luft

Detektion: Die Platte wird mit Anisaldehyd-Reagenz R besprüht, bei 150 °C unter Beobachtung bis zur deutlichen Farbentwicklung der Zonen erhitzt und im Tageslicht ausgewertet.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können die braunviolette Zone des β -Asaron sowie weitere verschiedenfarbige Nebenzonen vorhanden sein.

Oberer Plattenrand	
Anethol: eine violette Zone	eine rotviolette Zone eine blaviolette Zone eine braunviolette Zone
β -Asaron: eine braunviolette Zone	eine braunviolette Zone (β -Asaron) eine violette Zone
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 2 Prozent

β -Asaron: Flüssigchromatographie (2.2.29): max. 0,5 %

Untersuchungslösung: 0,200 g gepulverte Droge (710) werden mit 60 ml Methanol R 10 min lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Mischung in einen 100-ml-Messkolben filtriert. Das Filtrat wird unter Nachwaschen des Filters und des Rückstands mit Methanol R auf 100,0 ml ergänzt und anschließend durch ein Membranfilter aus regenerierter Cellulose von 0,45 μ m nominaler Porenweite filtriert.

Referenzlösung a: 10,0 mg β -Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Methanol R zu 100,0 ml ergänzt.

Referenzlösung b: 10,0 mg α -Asaron R werden mit Methanol R zu 100,0 ml gelöst. 2,0 ml dieser Lösung werden mit Referenzlösung a zu 20,0 ml ergänzt.

Säule:

- Größe: $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4$ mm
- Stationäre Phase: octylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 μ m)

Mobile Phase: 60 Volumenteile Acetonitril R und 40 Volumenteile Wasser R

Durchflussrate: 1,0 ml \cdot min⁻¹

Detektion: Spektrometer bei 303 nm

Einspritzen: 20 μ l

Eignungsprüfung: Referenzlösung b

- mindestens 1,2 zwischen den Peaks von β -Asaron und α -Asaron
Falls erforderlich wird der Anteil an Acetonitril in der mobilen Phase geändert.

Der Prozentgehalt an β -Asaron (C₁₂H₁₆O₃) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{F_u \times e_r \times 10 \times p}{F_r \times e_u \times 100}$$

F_u = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Untersuchungslösung

F_r = Peakfläche von β -Asaron im Chromatogramm der Referenzlösung

p = Prozentgehalt an β -Asaron in β -Asaron R

e_r = Einwaage β -Asaron R in Gramm

e_u = Einwaage Droge in Gramm

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 12,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (710) durch 2 h langes Trocknen bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 6,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Die Bestimmung erfolgt nach „Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls in Drogen“ (2.8.12) unter Verwendung von 10,0 g unmittelbar vorher gepulverter Droge (710), einem 1000-ml-Rundkolben, 500 ml Wasser *R* als Destillationsflüssigkeit und 0,5 ml Xylol *R* als Vorlage. Es empfiehlt sich, zwei oder drei Tropfen Dimeticon als Entschäumer vor Beginn der Destillation in den Rundkolben zu geben. Die Destillation erfolgt 4 h lang mit einer Destillationsgeschwindigkeit von 2 bis 3 ml je Minute.

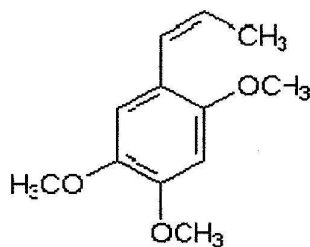
Lagerung

Vor Licht geschützt

ANHANG

Reagentien

β -Asaron¹



cis- β -Asaron

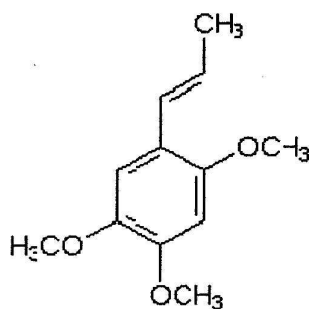
$C_{12}H_{16}O_3$

$M_r = 208,26$

CAS No. 5273-86-9

cis-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(Z)-1-propenylbenzol

α -Asaron²



trans- α -Asaron

$C_{12}H_{16}O_3$

$M_r = 208,26$

CAS No. 2883-98-9

trans-1-Propenyl-2,4,5-trimethoxybenzol, 1,2,4-Trimethoxy-5-(E)-1-propenylbenzol

¹ Lieferant PhytoLab ist geeignet

² Lieferant Fluka ist geeignet

Flos Croci

Safran

Crocus, Croci stigma

Safran besteht aus den meistens durch ein kurzes Griffelstück zusammengehaltenen Narben von *Crocus sativus* L.

Beschreibung

Die Droge hat einen aromatischen, charakteristischen Geruch und einen würzigen, leicht bitteren, jedoch nicht süßen Geschmack.

Die ziegelroten Narben sind in trockenem Zustande 20 bis 40 mm, in nassem Zustande 35 bis 50 mm lang. Die auf einer Seite aufgespalteten Röhren erweitern sich nach oben. Der obere Rand ist offen und feingezackt. Das die 3 Narben zusammenhaltende Griffelstück ist blaßgelb und höchstens 5 mm lang.

Mikroskopische Merkmale: Die Epidermiszellen sind von gestreckter Form und weisen oft im Zentrum eine kurze Papille auf; in Wasser lassen sie einen gelben Farbstoff austreten. Der obere Rand der Narben besitzt fingerartige, bis 150 µm lange Papillen. Zwischen den Papillen finden sich einzelne kugelige, bis 100 µm messende Pollenkörner mit fein getüpfelter Exine. Die Leitbündel enthalten enge Gefäße mit spiraligen Verdickungen; Fasern fehlen.

Verholzte Elemente, Pollenkörner mit 3 Poren, Fragmente des Endotheciums von Antheren und Kristalle fehlen.

Prüfung auf Reinheit

Chromatographie: Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (Ph. Eur. V.6.20.2) unter Verwendung einer Schicht von Kieselgel GF₂₅₄(R).

Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagensglas (60 mm × 7 mm) mit Hilfe eines Glasstabes sorgfältig zerstoßen und mit 1 Tropfen Wasser benetzt. Nach 2 bis 3 Minuten wird 1 ml Methylalkohol (R) hinzugefügt, 20 Minuten lang unter Lichtausschluß stehengelassen und durch Glaswolle abfiltriert.

Vergleichslösung: 5 mg Naphtholgelb (Ph. Eur. VII.1.1) werden in 5 ml Methylalkohol (R) gelöst. Getrennt werden 5 mg Sudanrot G (R) in 5 ml Chloroform (R) gelöst. Die beiden Lösungen werden vereinigt.

Getrennt werden auf einen Startpunkt 5 µl Untersuchungslösung oder auf eine Startlinie von 15 mm Länge und 3 mm Breite 10 µl Untersuchungslösung und 5 µl Vergleichslösung aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt über eine Laufstrecke von 10 cm mit einer Mischung von 65 Volumteilen Essigsäureäthylester (R), 25 Volumteilen *iso*-Propylalkohol (R) und 10 Volumteilen Wasser. Nach Verdunsten der mobilen Phase wird das Chromatogramm im ultravioletten Licht bei 254 nm und im Tageslicht ausgewertet, anschließend mit Anisaldehyd-Lösung (R) besprüht und im Tageslicht ausgewertet, anschließend mit Anisaldehyd-Lösung (R) besprüht und unter Beobachtung 5 bis 10 Minuten lang bei 105° C erhitzt. Bei der Auswertung im Tageslicht muß das Chromatogramm der Untersuchungslösung im unteren Drittel drei gelbe Zonen zeigen, wobei die unterste am stärksten ist (Crocine). Diese Zone entspricht in Farbe und Größe der Martiusgelb-Zone im Chromatogramm der Vergleichslösung. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung muß beim Auswerten im ultravioletten Licht bei 254 nm etwa auf der gleichen Höhe eine dunkle Zone zeigen (Picrocrocine). Auf der Höhe von Sudanrot G muß das Chromatogramm der Untersuchungslösung eine weitere dunkle Zone zeigen (β-Hydroxycyclocitral). Nach Besprühen mit Anisaldehyd-Lösung (R) sind Crocine und Picrocrocine graublau gefärbt.

Das Chromatogramm der Untersuchungslösung darf vor Besprühen keine weiteren gefärbten Zonen (insbesondere gelbe, orange oder rote) in Nähe der Startlinie zeigen (Zersetzungsprodukte von Crocine und/oder fremde Farbstoffe).

Färbevermögen: 0,10 g mittelfein gepulverte (V) Droge werden 2 Stunden lang unter gelegentlichem Schütteln mit 100 ml Wasser extrahiert. Es wird nitriert. 10 ml Filtrat, mit Wasser zu 100 ml verdünnt, dürfen nicht schwächer gefärbt sein als eine 0,05prozentige Lösung (m/V) von Kaliumdichromat (R).

Trocknungsverlust (Ph. Eur. V.6.22): Höchstens 10,0 Prozent, mit 0,20 g Droge durch Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105° bestimmt.

Sulfatasche (Ph. Eur. V.3.2.14): Höchstens 8,0 Prozent, mit dem Rückstand der vorhergehenden Prüfung bestimmt.

Aufbewahrung

Gut verschlossen, vor Licht geschützt.

Abbildung 35 - Monographie Safran
(aus ÖAB 2010)

Ph.Eur.

6.0/2.02.05.00

2.2.5 Relative Dichte

Die relative Dichte $d^{20/20}$ einer Substanz ist das Verhältnis zwischen der Masse eines bestimmten Volumens dieser Substanz bei der Temperatur t_1 und der Masse eines gleichen Volumens Wasser bei der Temperatur t_2 .

Wenn nichts anderes angegeben ist, wird die relative Dichte $d^{20/20}$ verwendet. Die relative Dichte wird häufig auch als $d^{20/4}$ ausgedrückt. Die Dichte ρ_{20} einer Substanz ist das Verhältnis ihrer Masse je Volumeneinheit bei 20 °C und kann auch verwendet werden. Sie wird in Kilogramm je Kubikmeter oder Gramm je Kubikzentimeter ($1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} = 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) ausgedrückt.

Die folgenden zahlenmäßigen Bedingungen gelten zwischen der relativen Dichte und der Dichte, ausgedrückt in Gramm je Kubikzentimeter:

$$\rho_{20} = 0,998\,203 \cdot d^{20/20} \text{ oder } d^{20/20} = 1,001\,80 \cdot \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 0,999\,972 \cdot d^{20/4} \text{ oder } d^{20/4} = 1,000\,03 \cdot \rho_{20}$$

$$d^{20/4} = 0,998\,230 \cdot d^{20/20}$$

Die relative Dichte oder die Dichte werden mit der in der Monographie vorgeschriebenen Anzahl Dezimalstellen mit Hilfe eines Pyknometers (Feststoffe oder Flüssigkeiten), einer hydrostatischen Waage (Feststoffe), eines Aräometers (Flüssigkeiten) oder eines digitalen Densimeters, ausgestattet mit einem Schwingungswandler (Flüssigkeiten und Gase), gemessen. Der Luftauftrieb wird bei der Wägung nicht berücksichtigt, was eine Unsicherheit von 1 Einheit in der dritten Dezimalstelle zur Folge haben kann. Bei der Verwendung eines Densimeters hat der Luftauftrieb keinen Einfluss.

Densimeter mit Schwingungswandler: Das Gerät besteht aus

- einem U-Rohr, normalerweise aus Borosilicatglas, das die zu untersuchende Flüssigkeit enthält
- einem System mit elektromagnetischer oder piezoelektrischer Anregung, welches das U-Rohr bei einer charakteristischen Frequenz, die von der Dichte der zu untersuchenden Flüssigkeit abhängt, schwingen lässt wie bei einem freischwingenden Oszillator
- einer Messeinrichtung, die die Schwingungsdauer (T) misst und an der unmittelbar die Dichte der Substanz abgelesen werden kann. Die Dichte kann auch mit Hilfe von T und den Konstanten A und B nach den folgenden Gleichungen bestimmt werden.

Die Resonanzfrequenz (f) ist abhängig von der Federkonstante (c) und der Masse (m) des Systems:

$$f^2 = 1/T^2 = c/m \cdot 1/4\pi^2$$

Also ist:

$$T^2 = (M/c + \rho \cdot V/c) 4\pi^2$$

M = Masse des U-Rohrs

V = inneres Volumen des U-Rohrs

Die Einführung der beiden Konstanten $A = c/4\pi^2 \cdot V$ und $B = M/V$ führt zu der klassischen Gleichung für den Schwingungswandler:

$$P = A \cdot T^2 - B$$

Die Konstanten A und B werden bestimmt, indem das U-Rohr mit 2 verschiedenen Substanzen bekannter Dichte, wie zum Beispiel entgastem Wasser R und Luft, gefüllt wird und Messungen durchgeführt werden. Kontrollmessungen werden täglich mit entgastem Wasser R durchgeführt. Die dabei erhaltenen Messwerte dürfen höchstens um den spezifischen Fehler von den Referenzwerten $\rho_{20} = 0,998\,203 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ und $d_{20/20} = 1,000\,000$ abweichen. Zum Beispiel muss ein Gerät, das eine Genauigkeit von $0,0001 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ besitzt, den Wert $0,9982 \pm 0,0001 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ anzeigen, um für weitere Messungen geeignet zu sein. Anderenfalls ist eine erneute Anpassung erforderlich. Regelmäßig müssen mit zertifizierten Referenzsubstanzen durchgeführte Kalibrierungen erfolgen. Die Messungen selbst laufen nach dem gleichen Verfahren ab wie die Kalibrierung. Die zu prüfende Flüssigkeit wird, falls erforderlich, in einem Thermostat auf 20°C eingestellt, bevor sie in das U-Rohr gefüllt wird, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und um die für die Messung benötigte Zeit zu verkürzen. Faktoren, die die Messgenauigkeit beeinflussen, sind:

- Gleichförmigkeit der Temperatur über das gesamte U-Rohr
- ein nichtlinearer Dichtebereich
- überlagernde Resonanzeffekte
- Viskosität, wobei Lösungen mit einer höheren Viskosität als die der Kalibriersubstanz einen Dichtewert zeigen, der höher als der wahre Wert liegt.

Die Auswirkungen von Nichtlinearität und Viskosität können durch Verwendung von Kalibriersubstanzen, die eine ähnliche Dichte und Viskosität besitzen wie die zu untersuchende Flüssigkeit, vermieden werden (± 5 Prozent für die Dichte, ± 50 Prozent für die Viskosität). Das Densimeter kann Funktionen für die automatische Korrektur der Viskosität und für eine Korrektur von Fehlern durch Temperaturänderungen und Nichtlinearität haben.

Die Präzision hängt von der Wiederholpräzision und der Stabilität der Schwingungsfrequenz ab, die wiederum von der Stabilität des Volumens, der Masse und der Federkonstante der Kammer abhängt.

Densimeter ermöglichen Messungen mit Abweichungen in der Größenordnung von $1 \cdot 10^{-3}$ bis $1 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ und eine Wiederholpräzision von $1 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

6.0/2.02.27.00

2.2.27 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Trennmethode, bei der die stationäre Phase aus einem geeigneten Material besteht, das gleichmäßig und in dünner Schicht auf einen Träger (Platte) aus Glas, Metall oder Kunststoff aufgetragen ist. Die zu untersuchenden Lösungen werden vor der Entwicklung auf die Platte aufgetragen. Die Trennung geschieht auf der Grundlage von Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch oder von Kombinationen dieser Vorgänge. Sie erfolgt durch Migration (Entwicklung) der Lösungen /zu untersuchenden Substanzen) mit einem Lösungsmittel oder einer geeigneten Mischung von Lösungsmitteln (Fließmittel) auf der Dünnschicht (stationäre Phase).

Apparatur

Platten: Die Chromatographie wird mit vorgefertigten beschichteten Platten, die den Beschreibungen unter „4.1.1 Reagenzien“ entsprechen, durchgeführt.

Vorbehandlung der Platten: vor der Trennung kann ein Waschen der Platten erforderlich sein. Das Waschen kann durch Entwicklung mit einem geeigneten Lösungsmittel erfolgen. Die Platten können auch durch Entwicklung, Eintauchen oder Besprühen imprägniert werden. Falls erforderlich können die Platten unmittelbar vor der Anwendung durch 20 min langes Erhitzen im Trockenschrank bei 120° aktiviert werden,

Die **Chromatographiekammer** hat einen flachen Boden oder 2 Wannen und besteht aus durchsichtigem, inertem Material mit einem dicht schließenden Deckel. Die Größe der Kammer richtet sich nach den verwendeten Platten. Zur horizontalen Entwicklung ist die Kammer mit einer Wanne für Fließmittel ausgestattet und enthält zusätzlich eine Vorrichtung, um das Fließmittel auf die stationäre Phase zu leiten.

Mikropipetten, Mikrospritzen, kalibrierte Einweg-Kapillaren oder andere Geräte, mit denen Lösungen sachgemäß aufgetragen werden können

Ein **Gerät zum Nachweis der Fluoreszenz**, zur Bestimmung der direkten Fluoreszenz oder der Fluoreszenzminderung

Vorrichtungen und Reagenzien zum Sichtbarmachen: Geeignete Vorrichtungen zur Derivatisierung durch Aufbringen von Reagenzien auf die Platte (Besprühen, Eintauchen oder Behandeln mit Gasen) und, falls zutreffend, zum Erhitzen der Platte werden verwendet, um die voneinander getrennten Bestandteile sichtbar zu machen.

Dokumentation: Sichtbar gemachte Chromatogramme können beispielsweise in einer Fotografie oder in einer Computerdatei dokumentiert werden.

Ausführung:

Auftragen der Probe: In einer geeigneten Entfernung von der Unterkante und den Seitenkanten der Platte wird das vorgegebene Volumen der Lösungen auf eine parallel zur Unterkante der Platte verlaufenden Linie aufgetragen, so dass die Zentren runder Flecke mindestens 10 mm (5 mm bei Verwendung von Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie), die Ränder bandförmiger Zonen mindestens 5 mm (2 mm bei Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie) voneinander entfernt liegen. Die Lösungen werden in genügend kleinen Mengen aufgetragen, um runde Flecke von 2 bis 5 mm Durchmesser (1 bis 2 mm Durchmesser bei Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie) oder bandförmige Zonen von 1 bis 2 mm Breite und 10 bis 20 mm Länge (5 bis 10 mm Länge bei Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie) zu erhalten.

Wenn laut Vorschrift in einer Monographie sowohl normale als auch Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie verwendet werden können, sind die Arbeitsbedingungen bei der Verwendung der Platten zur Hochleistungsdünnschichtchromatographie in eckigen Klammern [] hinter denen der normalen Platten aufgeführt.

Vertikale Entwicklung: Die Chromatographiekammer wird mit Filterpapier ausgekleidet. In die Chromatographiekammer wird eine im Verhältnis zum Inhalt der Kammer ausreichende Menge des Fließmittels gegeben, die nach Imprägnieren des Filterpapiers eine im Verhältnis zu den Maßen der verwendeten Platte ausreichende Fließmittelhöhe ergibt. Zur Sättigung der Chromatographiekammer wird der Deckel aufgesetzt und die

verschlossene Kammer 1 h lang bei 20 bis 25 °C stehen gelassen. Wenn in der Monographie nichts anderes angegeben ist, wird die Chromatographie in einer gesättigten Kammer durchgeführt.

Das vorgeschriebene Volumen der Lösungen wird wie zuvor beschrieben aufgetragen.

Nach Verdunsten des Lösungsmittels der aufgetragenen Lösungen wird die Platte möglichst vertikal in die Chromatographiekammer gestellt, wobei die Flecke oder Zonen auf den Auftragspunkten immer oberhalb des Niveaus des Fließmittels bleiben müssen. Die Kammer wird geschlossen und vor direktem Sonnenlicht geschützt bei einer Temperatur zwischen 20 und 25 °C gehalten. Wenn das Fließmittel die vorgeschriebene Laufstrecke, zwischen den Auftragspunkten und der Fließmittelfront gemessen, zurückgelegt hat, wird die Platte herausgenommen und getrocknet. Die Chromatogramme werden wie vorgeschrieben sichtbar gemacht.

Bei der zweidimensionalen Chromatographie werden die Platten nach der ersten Entwicklung getrocknet und ein zweites Mal senkrecht zur ersten Laufrichtung entwickelt.

Horizontale Entwicklung: Das vorgeschriebene Volumen der Lösungen wird wie zuvor beschrieben aufgetragen.

Nach Verdunsten des Lösungsmittels der aufgetragenen Lösungen wird mit einer Spritze oder Pipette eine ausreichende Menge des Fließmittels in die Wanne der Kammer gegeben. Die Platte wird in die Kammer gelegt, überprüft, ob sie waagrecht liegt, und das Fließmittel nach den Angaben des Herstellers auf die stationäre Phase geleitet. Falls in der Monographie vorgeschrieben, wird die Platte mit einem gleichzeitigen Start auf beiden Seiten entwickelt. Die Kammer wird verschlossen und bei einer Temperatur zwischen 20 und 25 °C gehalten. Wenn das Fließmittel die in der Monographie vorgeschriebene Laufstrecke zurückgelegt hat, wird die Platte herausgenommen und getrocknet. Die Chromatogramme werden wie vorgeschrieben sichtbar gemacht.

Bei der zweidimensionalen Chromatographie werden die Platten nach der ersten Entwicklung getrocknet und ein zweites Mal senkrecht zur ersten Laufrichtung entwickelt.

Visuelle Auswertung

Identifizierung: Der Hauptfleck im Chromatogramm der Untersuchungslösung wird visuell in Bezug auf Farbe, Größe und Retardationsfaktor (R_F) mit dem entsprechenden Fleck im Chromatogramm der Referenzlösung verglichen.

Der Retardationsfaktor (R_F) ist als Quotient aus der Laufstrecke der Substanz (gemessen vom Auftragspunkt bis zum Mittelpunkt des Substanzflecks) zur Laufstrecke des Fließmittels (ebenfalls gemessen vom Auftragspunkt) definiert.

Überprüfung des Trennvermögens für die Identifizierung: Im Allgemeinen ist eine Durchführung der Chromatographie nach der unter „4.1.1 Reagenzien“ beschriebenen Eignungsprüfung ausreichend. Lediglich in speziellen Fällen werden zusätzliche Anforderungen an die Durchführung in der Monographie vorgeschrieben.

Prüfung auf verwandte Substanzen: Ein Nebenfleck oder mehrere Nebenflecke im Chromatogramm der Untersuchungslösung wird (werden) visuell entweder mit dem entsprechenden Fleck (den entsprechenden Flecken) im Chromatogramm der Referenzlösung, die diese Veruneinigung(en) enthält, verglichen oder mit dem Fleck im

Chromatogramm der Referenzlösung, die durch Verdünnen der Untersuchungslösung hergestellt wurde.

Überprüfung des Trennvermögens: Die Anforderungen an das Trennvermögen sind in den einzelnen Monographien vorgeschrieben.

Überprüfung des Detektionsvermögens: Das Detektionsvermögen wird als zufriedenstellend erachtet, wenn der Fleck oder die Zone im Chromatogramm der am stärksten verdünnten Referenzlösung klar sichtbar ist.

Bezüglich der Vorschriften zur Ausführung der Quantitativen Bestimmung wird auf die Ph.Eur 6.0/2.02.27.00 verwiesen, da die Dünnschichtchromatographie hier nur zur qualitativen Analyse diene.

6.0/2.02.29.00

2.2.29 Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie (LC, liquid chromatography) ist eine chromatographische Trennmethode, die auf Unterschieden in der Verteilung der Substanzen zwischen 2 nicht mischbaren Phasen beruht, wobei eine flüssige mobile Phase die in einer Säule befindliche stationäre Phase durchläuft.

Die LC beruht hauptsächlich auf den Prinzipien der Adsorption, der Massenverteilung, des Ionenaustauschs, des Molekülgrößenausschlusses oder auf stereochemischen Wechselwirkungen.

Apparatur

Das Gerät besteht aus einem Pumpsystem, einem Probeneinlass, einer Chromatographiesäule (gegebenenfalls thermostatisiert), einem Detektor und einem Datenerfassungssystem (oder einem Integrator oder Schreiber). Die mobile Phase wird aus einem oder mehreren Vorratsbehältnissen gefördert und strömt im Allgemeinen mit konstanter Durchflussrate durch die Säule und anschließend durch den Detektor.

Pumpensysteme

Pumpensysteme für die LC sind erforderlich, um eine konstante Durchflussrate der mobilen Phase zu gewährleisten. Druckschwankungen sind möglichst gering zu halten, zum Beispiel indem das unter Druck stehende Lösungsmittel durch eine Vorrichtung zur Dämpfung von Druckschwankungen geleitet wird. Schläuche und Verbindungen müssen dem durch das Pumpsystem erzeugten Druck standhalten. Pumpen für die LC könne mit einer Vorrichtung zum Entfernen von Luftblasen versehen sein.

Durch Mikroprozessoren gesteuerte Systeme sind in der Lage, nach einem festgelegten Programm die mobile Phase entweder mit konstanter (isokratische Elution) oder wechselnder Zusammensetzung (Gradientenelution) genau zu fördern. Für die Gradientenelution stehen Pumpensysteme zur Verfügung, welche die Lösungsmittelkomponenten aus verschiedenen Vorratsbehältnissen fördern. Dabei kann das Mischen der Lösungsmittel entweder auf Niederdruck- oder Hochdruckseite der Pumpe(n) vorgenommen werden.

Probeneinlass

Die zu prüfende Lösung wird am oder nahe beim Säulenkopf in die strömende mobile Phase eingebracht. Hierzu ist ein Einspritzsystem erforderlich, das bei hohem Druck betrieben werden kann. Einspritzsysteme mit vorgegebenem Volumen einer Probenschleife oder variablen Volumen werden verwendet. Sie können entweder manuell oder mit Hilfe eines automatischen Probengebers betrieben werden. Eine manuell nur teilweise gefüllte Probenschleife kann zu einer geringeren Genauigkeit des Einspritzvolumens führen.

Stationäre Phasen

In der LC wird eine Vielzahl unterschiedlicher stationärer Phasen verwendet, wie

- Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, poröser Graphit für die Normalphasen-Chromatographie, bei der die Trennung auf unterschiedlicher Adsorption und/oder Massenverteilung beruht
- Austauschharze oder Polymere mit sauren oder alkalischen Gruppen für die Ionenaustauscherchromatographie, bei der die Trennung auf dem Verdrängungsgleichgewicht zwischen den aufzutrennenden Ionen und denen der mobilen Phase beruht
- Poröses Siliciumdioxid oder poröse Polymere für die Ausschlusschromatographie, bei der die Trennung auf Unterschieden des Molekülvolumens beruht, das heißt einem räumlichen Ausschluss
- Eine Vielzahl von chemisch modifizierten Trägermaterialien, hergestellt aus Polymeren, Siliciumdioxid oder porösem Graphit für die Umkehrphasen-LC, bei der das Trennprinzip hauptsächlich auf einer Verteilung der Moleküle zwischen der mobilen und der stationären Phase beruht
- Spezielle, chemisch modifizierte stationäre Phasen, wie Cellulose- oder Amylose-Derivate, Proteine oder Peptide, Cyclodextrine, für die Trennung von Enantiomeren (chirale Chromatographie).

Die meisten Trennungen beruhen auf Verteilungsmechanismen unter Verwendung von chemisch modifiziertem Siliciumdioxid als stationäre Phase und polaren Lösungsmitteln als mobile Phase. Die Oberfläche des Trägermaterials, zum Beispiel die Silanol-Gruppen des Siliciumdioxids, reagieren mit verschiedenen Silan-Reagenzien zu kovalent gebundenen Silyl-Derivaten, die eine unterschiedliche Anzahl aktiver Stellen an der Oberfläche des Trägermaterials besetzen. Die Natur der gebundenen Phase ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Trenneigenschaften chromatographischer Systeme.

Nachfolgend werden allgemein verwendete, gebundene Silyl-Phasen aufgeführt:

Octyl	Si[CH ₂] ₇ -CH ₃	C ₈
Octadecyl	Si[CH ₂] ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Phenylalkyl C ₆ H ₅	Si[CH ₂] _n -C ₆ H ₅	
Cyanopropyl	Si[CH ₂] ₃ -CN	CN
Aminopropyl	Si[CH ₂] ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	Si[CH ₂] ₃ -OCH(OH)-CH ₂ -OH	

Falls vom Hersteller nicht anders angegeben, können für die Umkehrphasen-Chromatographie Säulen auf Siliciumdioxid-Basis für mobile Phasen, die auf einen pH-Wert im Bereich zwischen 2,0 und 8,0 eingestellt sind, als stabil betrachtet werden. Säulen mit stationären Phasen aus porösem Graphit oder aus Polymermaterial, wie Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, sind über einen größeren pH-Bereich stabil.

In bestimmten Fällen kann die Normalphasen-Chromatographie mit nicht modifiziertem Siliciumdioxid, porösem Graphit oder chemisch modifiziertem (zum Beispiel Cyanopropylsilyl- oder Diol-Gruppen), polarem Siliciumdioxid als stationäre Phase durchgeführt werden.

Für Trennungen in der Analytik variiert die Teilchengröße der am häufigsten verwendeten stationären Phasen zwischen 3 und 10 μm . Die Teilchen können kugelförmig oder unregelmäßig geformt und von unterschiedlicher Porosität und spezifischer Oberfläche sein. Diese Parameter beeinflussen das Chromatographie-Verhalten der stationären Phase. Bei Umkehrphasen sind die chemische Natur der stationären Phase, das Ausmaß der gebundenen Stellen, ausgedrückt zum Beispiel durch die Angabe der Kohlenstoff-Beladung, und ob eine stationäre Phase, bei der restliche Silanol-Gruppen durch nachträgliche Silylierung („end-capping“) derivatisiert sind, vorliegt, zusätzlich bestimmende Faktoren. Der Nachlauf („peak tailing“), insbesondere bei basischen Substanzen, kann durch die Gegenwart restlicher Silanol-Gruppen hervorgerufen werden.

Falls in der betreffenden Monographie nichts anderes vorgeschrieben ist, werden für die analytische Chromatographie Säulen aus rostfreiem Stahl von unterschiedlicher Länge (l) und mit unterschiedlichem innerem Durchmesser (\emptyset) verwendet. Säulen mit einem inneren Durchmesser von weniger als 2 mm werden häufig als „Microbore“-Säulen bezeichnet. Die Temperatur der mobilen Phase und der Säule muss während der Analyse konstant gehalten werden. Die meisten Trennungen bei Raumtemperatur durchgeführt, jedoch können die Säulen erwärmt werden, um bessere Trenneffekte zu erzielen. Empfohlen wird, die Säulen nicht über 60 °C zu erhitzen, da dies zu einer Zersetzung der stationären Phase oder einer Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase führen kann.

Mobile Phasen

Bei der Normalphasen-Chromatographie werden Lösungsmittel geringer Polarität verwendet. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, muss der Gehalt an Wasser in der mobilen Phase sehr genau kontrolliert werden. Bei der Umkehrphasen-LC werden wässrige mobile Phasen mit organischen Zusätzen oder ohne solche eingesetzt.

Die Bestandteile der mobilen Phase werden normalerweise filtriert, um Teilchen mit einer Größe über 0,45 μm zu entfernen. Mobile Phasen aus mehreren Bestandteilen werden durch Abmessen der vorgeschriebenen Volumen (mit der Ausnahme, dass Massen vorgeschrieben sind) der Einzelkomponenten und anschließendes Mischen hergestellt. Alternativ können die Lösungsmittel-Komponenten mit einzelnen, durch Dosierventile regulierten Pumpen eingebracht werden, die das Mischen entsprechend dem gewünschten Verhältnis vornehmen. Vor dem Einpumpen werden die Lösungsmittel normalerweise durch Einleiten von Helium, durch Ultraschall oder durch in das System eingebrachte Membran-/Vakuummodule entgast, um das Auftreten von Gasblasen zu verhindern.

Die zur Herstellung der mobilen Phase verwendeten Lösungsmittel sind normalerweise frei von Stabilisatoren und im Falle eines UV-Detektors bei der Wellenlänge der Detektion durchlässig. Die verwendeten Lösungsmittel und anderen Bestandteile müssen von geeigneter Qualität sein. Der pH-Wert muss, falls erforderlich, im wässrigen Bestandteil

der mobilen Phase und nicht in der Mischung eingestellt werden. Werden Pufferlösungen verwendet, muss das System nach Abschluss der Chromatographie ausreichend mit einer Mischung von Wasser und dem organischen Bestandteil der mobilen Phase (5 Prozent V/V) gewaschen werden, um ein Auskristallisieren der Salze zu vermeiden.

Die mobilen Phasen können weitere Bestandteile enthalten, wie Gegen-Ionen bei der Ionenpaar-Chromatographie oder einen chiralen Selektor bei der Chromatographie mit einer nicht chiralen stationären Phase.

Detektoren

Spektrometer im ultravioletten-sichtbaren (UV-Vis-)Bereich einschließlich Dioden-Array-Detektoren sind die am häufigsten verwendeten Detektoren. Fluoreszenz-Spektrometer, Differenzial-Refraktometer, elektrochemische Detektoren, Massenspektrometer, Lichtstreuungs- und Radioaktivitätsdetektoren sowie andere spezielle Detektoren können ebenfalls verwendet werden.

Ausführung

Die Säule wird mit der vorgeschriebenen mobilen Phase und Durchflussrate, bei Raumtemperatur oder der in der Monographie angegebenen Temperatur so lange äquilibriert, bis eine stabile Basislinie erhalten wird. Die vorgeschriebene(n) Untersuchungslösung(en) und die Referenzlösung(en) werden hergestellt. Die Lösungen müssen frei von festen Bestandteilen sein.

Bewertungskriterien zur Eignung des Systems sind unter „2.2.46 Chromatographische Trennmethode“ beschrieben. In dieser Allgemeinen Methode ist ebenfalls angegeben, in welchem Maße Änderungen der Parameter des Chromatographie-Systems vorgenommen werden können, um die Kriterien der Systemeignung zu erfüllen.

6.0/2.02.32.00

2.2.32 Trocknungsverlust

Der Trocknungsverlust ist der in Prozent (m/m) angegebene Masseverlust.

Ausführung: Die vorgeschriebene Menge Substanz wird in ein gewogenes Wägegias, das zuvor unter den bei der Substanz angegebenen Bedingungen getrocknet wurde, eingewogen. Die Substanz wird bis zur Massekonstanz oder während der vorgeschriebenen Zeit bei der angegebenen Temperatur getrocknet. Die Ausführung erfolgt nach einem der nachfolgend angegebenen Verfahren. Wenn die Trocknungstemperatur mit einem einzelnen Wert an Stelle eines Bereichs angegeben ist, wird die Trocknung bei der vorgeschriebenen Temperatur $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

- Im Exsikkator* über Phosphor(V)-oxid *R* bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur („im Exsikkator“);
- im Vakuum* über Phosphor(V)-oxid *R* bei einem Druck zwischen 1,5 und 2,5 kPa und Raumtemperatur („im Vakuum“);
- im Vakuum* über Phosphor(V)-oxid *R* bei einem Druck zwischen 1,5 und 2,5 kPa und innerhalb des in der Monographie angegebenen Temperaturbereichs („im Vakuum, mit Angabe der Temperatur“);
- im Trockenschrank* und innerhalb des in der Monographie angegebenen Temperaturbereichs („im Trockenschrank, mit Angabe der Temperatur“);

- e) *im Hochvakuum* über Phosphor(V)-oxid *R* bei einem 0,1 kPa nicht überschreitenden Druck und der in der Monographie angegebenen Temperatur („im Hochvakuum“)

Werden andere Trocknungsbedingungen vorgeschrieben, werden diese ausführlich in der betreffenden Monographie beschrieben.

6.0/2.04.14.00

2.4.14 Sulfatasche

Ein geeigneter Tiegel (zum Beispiel aus Silicat, Platin, Porzellan oder Quarzglas) wird 30 min lang bei 600 ± 50 °C geglüht, im Exsikkator über Silicagel oder einem anderen geeigneten Trockenmittel erkalten gelassen und gewogen. Die vorgeschriebene Menge der zu prüfenden Substanz wird in den Tiegel gegeben und beides zusammen gewogen. Die Substanz wird mit einer geringen Menge Schwefelsäure *R* (im Allgemeinen 1 ml) befeuchtet und vorsichtig bei möglichst niedriger Temperatur erhitzt, bis die Substanz vollständig verkohlt ist. Nach dem Abkühlen wird der Rückstand mit einer geringen Menge Schwefelsäure *R* (im Allgemeinen 1 ml) befeuchtet, vorsichtig erhitzt, bis keine weißen Dämpfe mehr entstehen, und so lange bei 600 ± 50 °C geglüht, bis der Rückstand vollständig verascht ist. Dabei dürfen während der gesamten Veraschung keine Flammen entstehen. Nach dem Erkalten im Exsikkator über Silicagel oder einem anderen geeigneten Trockenmittel wird der Tiegel erneut gewogen und der Prozentanteil an Rückstand berechnet.

Wenn der so erhaltene Wert für den Prozentanteil an Rückstand den vorgeschriebenen Grenzwert überschreitet, werden das Befeuchten mit Schwefelsäure *R* und das Glühen, wie vorstehend beschrieben, in 30-min-Intervallen wiederholt, bis 2 aufeinanderfolgende Wägungen nur noch eine Differenz von höchstens 0,5 mg ergeben oder bis der Prozentanteil an Rückstand dem vorgeschriebenen Grenzwert entspricht.

Die Substanzmenge für diese Prüfung (üblicherweise 1 bis 2 g) wird so gewählt, dass bei dem vorgeschriebenen Grenzwert der Rückstand (in der Regel etwa 1 mg) noch mit ausreichender Genauigkeit gewogen werden kann.

6.0/2.08.16.00

2.8.16 Trockenrückstand von Extrakten

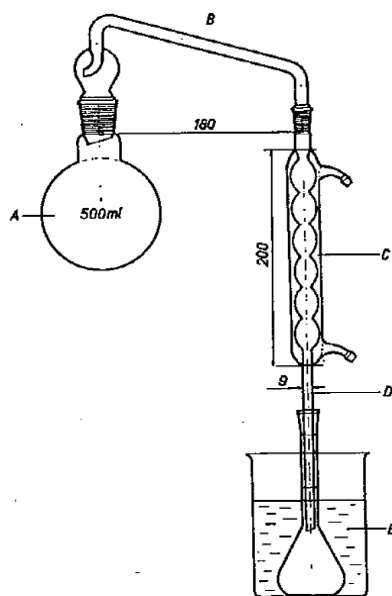
In ein Wägegglas mit flachem Boden von etwa 50 mm Durchmesser und etwa 30 mm Höhe werden rasch 2,00 g des Extrakts eingewogen oder 2,0 ml des Extrakts gegeben und im Wasserbad zur Trockne eingedampft. Nach 3h langem Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105 °C wird der Rückstand im Exsikkator über Phosphor(V)-oxid *R* oder Silicagel *R* erkalten gelassen und gewogen.

Das Ergebnis wird in Prozent (*m/m*) oder in Gramm je Liter berechnet.

2.9.10 Ethanolgehalt

Flüssige ethanolische Zubereitungen, für welche die vorliegende Methode anwendbar ist, enthalten auch gelöste Substanzen, die notwendigerweise vom zu bestimmenden Ethanol durch Destillation zu trennen sind. Wenn diese Destillation neben Ethanol und Wasser auch andere flüchtige Substanzen überführt, sind die eventuell zu treffenden Vorsichtsmaßnahmen in der Monographie angegeben.

Der Ethanolgehalt einer Flüssigkeit gibt die Volumenanteile Ethanol in 100 Volumenteilen der Flüssigkeit bei $20 \pm 0,1$ °C an. Dieser Wert ergibt den „Ethanolgehalt in Prozent (V/V)“. Der Gehalt kann auch in Gramm Ethanol je 100 g Flüssigkeit ausgedrückt werden und gibt dann den „Ethanolgehalt in Prozent“ (m/m) an. Die Beziehung zwischen Dichte bei $20 \pm 0,1$ °C, der relativen Dichte $d_{20/20}$ (auf Vakuum korrigiert) und dem Ethanolgehalt von Ethanol-Wasser-Mischungen ist in den Tabellen der International Organisation for Legal Metrology (1992), International Recommendation Nr. 22, angegeben.



Apparatur: Die Apparatur (siehe Abb. 2.9.10-1) besteht aus einem Rundkolben (A), der über eine Destillationsbrücke mit Tropfenfänger (B) mit einem senkrechten Kühler (C) verbunden ist. Das untere Kühlerende ist mit einem Vorstoß (D) versehen, der in einen 100- oder 250-ml-Messkolben reicht. Der Messkolben steht während der Destillation in einer Eis-Wasser-Mischung (E). Ein Keramik-Drahtnetz mit einer runden Öffnung von 6 cm Durchmesser unter dem Rundkolben (A) soll das Verkohlen von ungelösten Stoffen vermeiden.

Abb. 2.9.10-1: Apparatur zur Bestimmung des Ethanolgehalts
Längenangaben in Millimetern

Ausführung

Bestimmung mit Hilfe eines Pyknometers: In einem Destillationskolben werden 25,0 ml der bei $20 \pm 0,1$ °C abgemessenen Zubereitung gegeben, mit 100 bis 150 ml destilliertem Wasser R verdünnt und mit einigen Siedesteinchen versetzt. Nach Anbringen des Vorstoßes und Aufsetzen des Kühlers werden mindestens 90 ml in einen 100-ml-Messkolben destilliert. Das auf $20 \pm 0,1$ °C gebrachte Destillat wird mit destilliertem Wasser R von $20 \pm 0,1$ °C zu 100,0 ml verdünnt.

Die relative Dichte wird bei $20 \pm 0,1$ °C mit Hilfe eines Pyknometers bestimmt. Die in der Tabelle (Spalte 3, Ethanolgehalt) angegebenen Werte müsse mit 4 multipliziert werden, um den Ethanolgehalt in Prozent (V/V) in der Zubereitung zu erhalten. Das Ergebnis wird nach der Berechnung auf eine Dezimalstelle nach dem Komma gerundet.

Bestimmung mit Hilfe eines Aräometers: In den Destillationskolben werden 50,0 ml der bei $20 \pm 0,1$ °C abgemessenen Zubereitung gegeben, mit 200 bis 300 ml Wasser *R* verdünnt und wie zuvor der Destillation unterworfen. Mindestens 180 ml werden in einem 250-ml-Messkolben destilliert. Das auf $20 \pm 0,1$ °C gebrachte Destillat wird mit destilliertem Wasser *R* von $20 \pm 0,1$ °C zu 250,0 ml verdünnt.

Das Destillat wird in einen Zylinder gegeben, dessen Durchmesser mindestens 6 mm größer ist als der Durchmesser des Aräometers.

Wenn die Menge zur Bestimmung nicht genügt, wird doppelt so viel verwendet und mit destilliertem Wasser *R* von $20 \pm 0,1$ °C zu 500 ml verdünnt. Der gefundene Gehalt wird mit 5 multipliziert, um der Verdünnung während der Destillation Rechnung zu tragen.

Das Ergebnis wird nach der Berechnung auf eine Dezimalstelle nach dem Komma abgerundet.

6.0/2.09.11.00

2.9.11 Prüfung auf Methanol und 2-Propanol

Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Gaschromatographie (2.2.28).

Interner-Standard-Lösung: Eine 2,5-prozentige Lösung (*V/V*) von 1-Propanol *R* in wasserfreiem Ethanol *R* 1 wird hergestellt.

Untersuchungslösung a: Einer bestimmten Menge des Destillats werden 2,0 ml Interner-Standard-Lösung zugesetzt. Der Ethanolgehalt (2.9.10) wird durch Verdünnen mit Wasser *R* auf 50 ml oder durch Zusatz von wasserfreiem Ethanol *R* 1 auf 10,0 Prozent (*V/V*) eingestellt.

Untersuchungslösung b: Der Ethanolgehalt (2.9.10) einer bestimmten Menge des Destillats wird durch Verdünnung mit Wasser *R* auf 50 ml oder durch Zusatz von wasserfreiem Ethanol *R* 1 auf 10,0 Prozent (*V/V*) eingestellt.

Referenzlösung a: 50 ml einer Lösung werden hergestellt, die 2,0 ml Interner-Standard-Lösung, 3,0 ml wasserfreies Ethanol *R* 1, 0,05 Prozent (*V/V*) 2-Propanol *R* und wasserfreies Methanol *R* in ausreichender Menge enthält, um einen Gesamtgehalt an Methanol von 0,05 Prozent (*V/V*) zu erhalten. Dabei muss der Methanolgehalt von wasserfreiem Ethanol *R* 1 berücksichtigt werden.

Referenzlösung b: Eine 10,0-prozentige Lösung (*V/V*) von wasserfreiem Ethanol *R* 1, die jeweils 0,0025 Prozent (*V/V*) Methanol *R* und 2-Propanol *R* enthält, wird hergestellt.

Säule

- Material: Quarzglas
- Größe: $l = 30$ m, Durchmesser = 0,53 mm
- Stationäre Phase: Poly [(cyanopropyl)(phenyl)][dimethyl]siloxan *R* (Filmdicke 3 µm)

Trägergas: Helium zur Chromatographie *R*

Durchflussrate: $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Splitverhältnis: 1:10

<i>Temperatur</i>		
	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Säule	0 – 5	35
	5 – 15	35 → 85
Probeneinlass		250
Detektor		250

Detektion: Flammenionisation

Einspritzen: 1,0 µl

Eignungsprüfung:

- 1-Propanol: Im Chromatogramm der Untersuchungslösung b darf kein dem 1-Propanol entsprechender Peak auftreten.
- Peak-Tal-Verhältnis: mindestens 15, wobei H_p die Höhe des Peaks von 2-Propanol über der Basislinie und H_v die Höhe des niedrigsten Punkts der Kurve über der Basislinie zwischen den Peaks von 2-Propanol und Ethanol im Chromatogramm der Referenzlösung a darstellen
- Signal-Rausch-Verhältnis: mindestens 10 für die Peaks von Methanol und 2-Propanol im Chromatogramm der Referenzlösung b

Der Gehalt an Methanol beziehungsweise 2-Propanol wird bezogen auf die zu prüfende Zubereitung berechnet.

6.0/1544

Kamillenfluidextrakt

Matricariae extractum fluidum

Gehaltsbestimmung

20,0 g Fluidextrakt werden in einem 1000,0-ml-Rundkolben mit 300 ml Wasser *R* versetzt und so lange destilliert, bis 200 ml Destillat in ein Auffanggefäß übergegangen sind. In einem Scheidetrichter werden 65 g Natriumchlorid *R* im Destillat gelöst. Die Lösung wird 3-mal mit je 30 ml Pentan *R* ausgeschüttelt, mit denen zuvor der bei der Destillation benutzte Kühler und das Auffanggefäß gespült wurden. Die vereinigten Pentanauszüge werden über 2 g wasserfreiem Natriumsulfat *R* getrocknet und in einen im Exsikkator 3 h lang getrockneten und gewogenen 100-ml-Rundkolben filtriert. Natriumsulfat und Filter werden 2-mal mit je 20 ml Pentan *R* gewaschen. Das Lösungsmittel wird in einem Wasserbad von 45 °C abdestilliert. Der letzte Rest Pentan wird durch einen Luftstrom 3 min lang abgeblasen. Der Kolben wird 3 h lang im Exsikkator getrocknet und anschließend gewogen. Das zurückbleibende Öl muss blau sein (Chamazulen).

Aus dem Reagenzienverzeichnis:

Reagenzien A

Anisaldehyd-Reagenz *R*

0,5 ml Anisaldehyd *R* werden mit 10 ml Essigsäure 99 % *R*, 85 ml Methanol *R* und 5 ml Schwefelsäure in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

Curriculum Vitae



Monika Heß
Degengasse 43/14
1160 Wien
Österreich

Tel.: 069911083423
E - Mail: monika.hesz@gmx.at
aon.912692235@aon.at

Persönliche Daten

geboren am:	20.Juli 1987
Staatsangehörigkeit :	Österreich
Familienstand:	ledig
Religionszugehörigkeit:	röm. kath.

Ausbildung

09/1993 – 06/1997	Volksschule Lorentz-Mandel-Gasse, 1160 Wien
09/1997 – 06/2005	BRG Schuhmeierplatz, 1160 Wien Neusprachlicher Zweig
06/2005	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
Seit 10/2005	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
02/2007	Abschluss des 1. Abschnitts
Sommersemester 2009	Übung aus Einführung in die Rechtswissenschaften, Vorbereitung auf die Einführungsprüfung
11/2009	Abschluss des 2. Abschnitts
03/2010	Inskription zum Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Wien
Seit 11/2009	Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie Universität Wien

Berufliche Praxis

08/2006	6-tägiges Praktikum; Laaerberg-Apotheke, 1100 Wien
08/2007	einmonatige Feriapraxis; Rotenhof-Apotheke, 1100 Wien
02/2008	einmonatige Feriapraxis; Wilhelminen-Apotheke, 1160 Wien
03/2008 – 04/2010	geringfügige Beschäftigung; Wilhelminen-Apotheke, 1160 Wien
Seit 05/2010	Vollzeitbeschäftigung; Wilhelminen-Apotheke, 1160 Wien
03/2008 – 06/2010	Tutorin im Praktikum Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung arzneistoffliefernder Organismen, Department für Pharmakognosie, Universität Wien